

UNIVERSITE DE GENEVE

Département de biologie végétale

FACULTE DES SCIENCES

Professeur H. GREPPIN

ACTIVITÉ PEROXYDASIQUE ET DÉVELOPPEMENT CHEZ SPINACIA OLERACEA

THESE

PRESENTÉE A LA FACULTE DES SCIENCES

DE L'UNIVERSITE DE GENEVE

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES BIOLOGIQUES

PAR

Claude PENEL

d e

Féchy (Vaud)

1974

THESE N° 1667

Genève

IMPRIMERIE DE LA
SECTION DE PHYSIQUE

1976

UNIVERSITE DE GENEVE

FACULTE DES SCIENCES

Département de biologie végétale

Professeur H. GREPPIN

ACTIVITÉ PEROXYDASIQUE ET DÉVELOPPEMENT CHEZ SPINACIA OLERACEA

THESE

PRESENTÉE A LA FACULTE DES SCIENCES

DE L'UNIVERSITE DE GENEVE

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES BIOLOGIQUES

PAR

Claude PENEL

d e

Féchy (Vaud)

THESE N° 1667

Genève

IMPRIMERIE DE LA
SECTION DE PHYSIQUE

1976

La faculté des sciences, sur le préavis du professeur ordinaire H. GREPPIN, directeur de thèse, et d'une Commission composée du professeur assistant M. KOBR (Faculté des sciences) et des professeurs T. GASPAR (Université de Liège) et P.-E. PILET (Université de Lausanne), autorise l'impression de la présente thèse, sans exprimer d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

Genève, le 8 juillet 1974

Le Doyen: J. MULLER

Thèse n^o 1667



REMERCIEMENTS

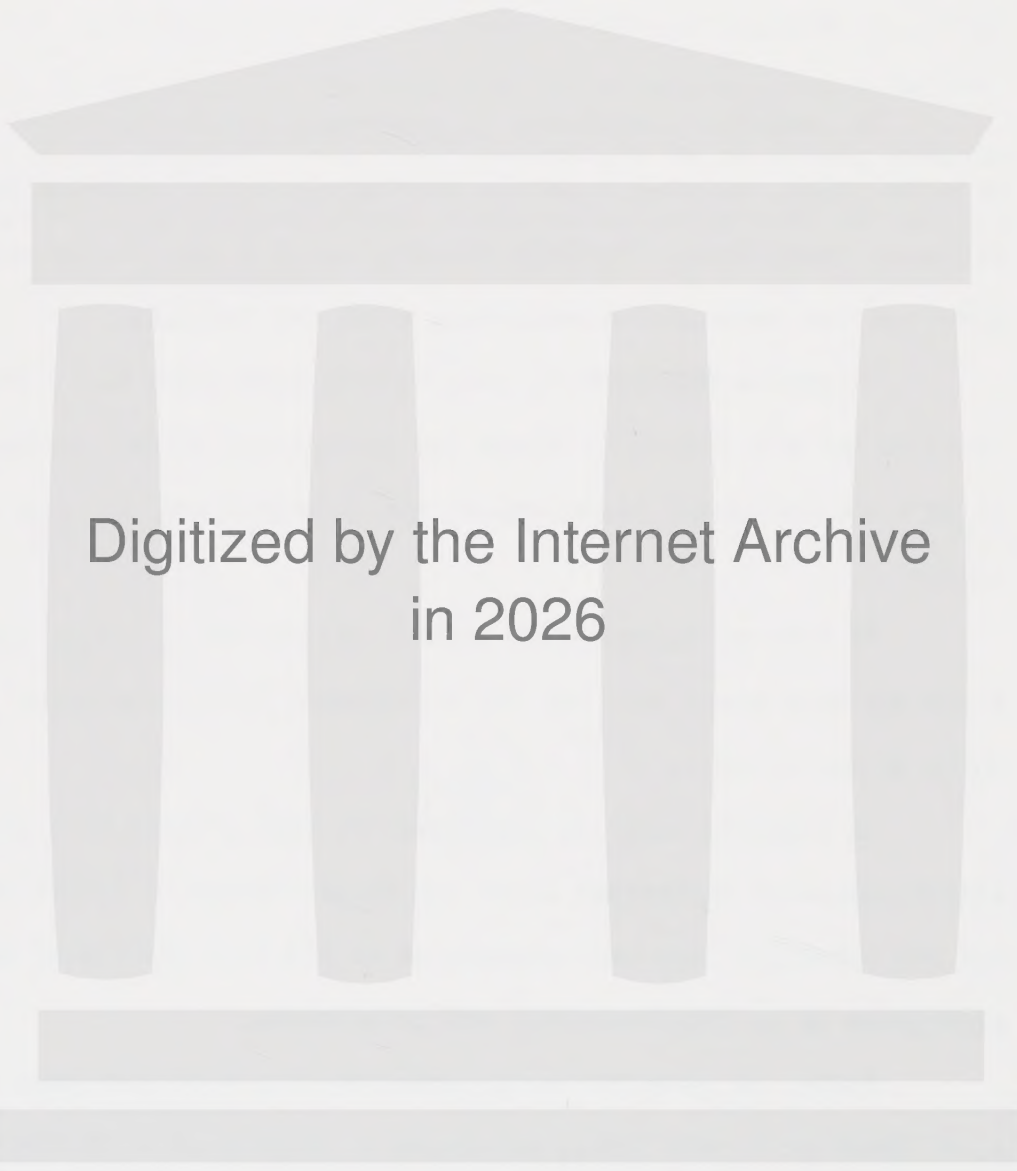
Je remercie sincèrement le professeur Hubert GREPPIN, directeur de cette thèse, de m'avoir permis d'effectuer cette recherche dans d'excellentes conditions. L'intérêt constant qu'il a porté à mon travail, ainsi que ses remarques stimulantes, m'ont été précieux.

J'exprime également ma gratitude au professeur P.-E. PILET de Lausanne qui m'a initié à l'étude des peroxydases et des auxine-oxydases et dont les critiques constructives ont constitué pour moi une aide précieuse.

Ma reconnaissance va au docteur Th. GASPAR de Liège. Les discussions que nous avons eues ont été extrêmement fructueuses pour la conduite de mon travail.

Je remercie aussi le professeur M. KOBR d'avoir bien voulu lire attentivement ce manuscrit ainsi que le professeur J. RICARD de Marseille qui m'a accueilli dans son laboratoire et m'a fait bénéficier de sa grande expérience de la physico-chimie des peroxydases.

Enfin, je remercie cordialement de leur aide précieuse mesdames A.-M. MONAT et L. VON TOBEL, messieurs A. ROSSIER et A. MESROBIAN, ainsi que tous mes camarades du laboratoire de physiologie végétale.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545902_0015

TABLE DES MATIERES

I.	INTRODUCTION	
1.	LA FLORAISON	p. 1
2.	LES PEROXYDASES	3
II.	BUT DU TRAVAIL ET PLAN EXPERIMENTAL	10
III.	MATERIEL ET METHODES	
1.	CULTURE DES PLANTES	14
2.	TRAITEMENTS	15
3.	DOSAGES	17
4.	EXTRACTION DES PEROXYDASES TOTALES	18
5.	SEPARATION DES PEROXYDASES SUR GEL SEPHADEX	21
6.	SEPARATION DES PEROXYDASES SUR GEL D'ACRYLAMIDE	22
7.	SEPARATION DES PEROXYDASES PAR ELECTROFOCALISATION	22
8.	SEPARATION ET DOSAGE DES PEROXYDASES BASIQUES	23
9.	PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES PEROXYDASES BASIQUES	24
IV.	ETUDE DES PEROXYDASES D'EPINARDS CULTIVES EN JOURS COURTS	
1.	PEROXYDASES TOTALES	26
2.	LES ISOPEROXYDASES	31
3.	LES PEROXYDASES BASIQUES	37
4.	RESUME	40
V.	ETUDE DES PEROXYDASES D'EPINARDS CULTIVES EN JOURS LONGS	
1.	PEROXYDASES TOTALES	41
2.	LES ISOPEROXYDASES	45
1.	Séparation sur gel Sephadex	45
2.	Electrophorèse sur gel d'acrylamide	48
3.	Electrofocalisation	49
3.	LES PEROXYDASES BASIQUES	53

VI.	EVOLUTION DES PEROXYDASES LORS DU TRANSFERT DE JOURS COURTS EN LUMIERE CONTINUE	56
1.	PEROXYDASES TOTALES	56
2.	LES ISOPEROXYDASES	
1.	Séparation des peroxydases sur gel Sephadex	59
2.	Séparation des peroxydases sur gel d'acrylamide	61
3.	Séparation des peroxydases par électrofocalisation	63
3.	LES PEROXYDASES BASIQUES	65
4.	INDUCTION MIMÉE	68
5.	RESUME	72
VII.	TRAITEMENTS HORMONAUX	74
1.	ACIDE GIBBERELLIQUE	74
2.	ACIDE 3-INDOLYL ACETIQUE	80
3.	LA KINETINE	84
4.	RESUME	86
VIII.	LE CONTROLE DE L'ACTIVITE PEROXYDASIQUE PAR LA LUMIERE	
1.	CULTURE EN LUMIERE ROUGE OU BLEUE	87
2.	LA LUMIERE ROUGE LOINTAIN ET LES PEROXYDASES BASQUES	92
3.	L'INDUCTION PHOTOPERIODIQUE ET LA REPONSE DES PEROXYDASES BASIQUES AU ROUGE LOINTAIN	101
4.	ROLE DE LA PHOTOSYNTHESE LORS DU TRANSFERT EN LUMIERE CONTINUE	104
5.	EFFET DE L'ACETYLCHOLINE SUR LES PEROXYDASES BASQUES	106
6.	DISCUSSION	110
7.	RESUME	113
IX.	MODIFICATIONS DES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES PEROXYDASES BASIQUES	114
X.	DISCUSSION GENERALE	
1.	LES ACTIVITES PEROXYDASIQUES TOTALES ET BASIQUES	121
2.	LES ISOPEROXYDASES ET LEUR ROLE DANS LA PLANTE	125

3.	MODIFICATIONS RAPIDES DE L'ACTIVITE DES PEROXYDASES BASIQUES	130
4.	RELATIONS ENTRE L'ETAT PHYSIOLOGIQUE DE LA PLANTE ET LE COMPORTEMENT DES PEROXYDASES BASIQUES	134
5.	LES PEROXYDASES ET LA FLORAISON	137
XI.	CONCLUSION	142
XII.	RESUME	144
XIII.	SUMMARY	147
XIV.	BIBLIOGRAPHIE	150

I. INTRODUCTION

I. 1. LA FLORAISON

Les Epinards sont des plantes qui ne fleurissent que lorsque la durée journalière de lumière est de 12 heures ou plus (plantes de jours longs). Soumises à des photopériodes de durée inférieure, les plantes demeurent à l'état végétatif (en rosette) ou, avec le temps, dans un état intermédiaire (Nougarède, 1965; Auderset, 1974); transférées de jours courts en jours longs, elles subissent une série de modifications biochimiques puis morphologiques qui, pour des plantes de 30 jours courts de 8 heures, aboutissent après une quinzaine de jours continus à la floraison proprement dite. Dès les premières heures de ce transfert, l'induction florale est enclenchée dans les feuilles qui émettent un signal vers le méristème caulinaire (Zeevaart, 1962; Evans, 1971). Celui-ci subit l'évocation florale: il modifie son fonctionnement végétatif en fonctionnement floral. Les premières manifestations de ce changement se révèlent au niveau de la division cellulaire (Bernier et al., 1967), des appareils transformateurs d'énergie (chloroplastes et mitochondries) et de la biosynthèse des acides nucléiques et des protéines (Jacquard et al., 1972), ainsi que de certaines activités enzymatiques (Klopper, 1973).

C'est dans les feuilles que se produisent les événements primaires de la floraison. Privé de feuilles au moment du transfert en conditions inductrices, un Epinard ne présente pas de signe d'évocation florale au niveau de son méristème apical (Auderset, 1974). La connaissance du méca-

nisme de l'induction florale passe donc par l'étude des processus essentiels qui se déroulent dans la feuille. Ces processus font intervenir un mécanisme de mesure du temps et des réactions photochimiques liés au phytochrome et à la photosynthèse. Cette dernière est indispensable à la floraison des plantes de jours longs, soit à cause de son apport énergétique (Bavrina et al., 1969; Sawhney et Cumming, 1971; Imhoff, 1973), soit par ses relations avec le phytochrome (Greppin et al., 1973).

On ne connaît pas les structures subcellulaires ni les métabolismes de la feuille engagés dans la production du stimulus floral. De plus, la nature de ce dernier demeure mystérieuse. Il s'agit avant tout d'une notion théorique destinée à expliquer les liens physiologiques observés entre les feuilles et l'apex. A ce sujet, trois hypothèses peuvent être retenues. Selon la première, le stimulus floral est une substance chimique (florigène ou hormone de floraison: Chaïlakhyan, 1936; Zeevaart, 1971b), qui migre des feuilles à l'apex; sa formation pourrait dépendre d'une ou de plusieurs enzymes dont l'activité, au moment de l'induction, devrait pouvoir être décelée. Dans la deuxième hypothèse, c'est un ou plusieurs métabolismes de la feuille qui sont modifiés par l'induction. Il en résulterait de subtils remaniements des échanges biochimiques avec l'apex, qui aboutiraient à une transformation du fonctionnement de celui-ci. Il devrait être possible dans ce cas de mettre en évidence de nombreuses modifications d'activités enzymatiques. Enfin, dans la troisième, la feuille émettrait, en photopériode favorable, un signal bioélectrique transmis peut-être par les membranes, ou bien cette photopériode modifierait l'équilibre bioélectrique de la plante. Le phytochrome et la photosynthèse pourraient être à l'origine de ce signal (Horwitz et Horwitz, 1973).

Il y a peu d'éléments qui permettent d'étayer l'une ou l'autre de ces hypothèses. Pour la troisième on peut avancer le fait que l'on mesure des différences de potentiel dans la plante lors de son passage de l'obscurité à la lumière (Rybin et al., 1972b; Greppin et al., 1973). Chez l'Epi-

nard, seules les feuilles de plantes induites émettent une réponse bio-électrique lorsqu'elles sont éclairées avec une lumière rouge lointain (730 nm).

L'existence d'une hormone de floraison n'a jamais été décelée de manière péremptoire, malgré le très grand nombre d'extractions réalisées (Harada, 1962). Il est évidemment possible que cette substance agisse en très petites quantités ou soit très labile.

Une des meilleures approches pour étudier les première et deuxième hypothèses est la recherche des activités enzymatiques qui peuvent être liées à la floraison. Jusqu'à présent, peu de travaux ont été réalisés dans ce domaine. Chez *Lemna perpusilla*, une plante de jour court, l'induction florale exigerait la participation d'une enzyme au moins (Khudairi et Maeng, 1973). Il existe certaines indications selon lesquelles une nouvelle protéine serait nécessaire dans la feuille lors des premières étapes de la floraison de *Xanthium* (Miller et Ross, 1966; Ross, 1970) et de *Lemna gibba* (Umemura et Oota, 1965).

On peut évidemment imaginer que le processus de l'induction florale est le résultat de simples modifications d'activités enzymatiques existant aussi bien chez les plantes non induites que chez les plantes induites.

I. 2. LES PEROXYDASES

Les peroxydases sont des enzymes extrêmement répandues chez les végétaux (Shannon, 1968). Elles sont généralement composées d'une protéine (apoenzyme) associée à une porphyrine ferrique (protohématine IX). Il s'agit d'enzymes peu spécialisées, capables, in vitro, de catalyser une foule de réactions biochimiques différentes. Elles peuvent agir en utilisant un peroxyde comme accepteur d'électrons, mais il arrive dans bien des cas qu'elles utilisent l'oxygène, auquel elles peuvent se lier

(oxyperoxydases), un peu comme l'hémoglobine ou la myoglobine (Tamura et Yamazaki, 1972).

Dans une même plante et, le plus souvent, dans une même cellule, il existe plusieurs peroxydases différentes par leur protéine et leur propriété catalytique. Ces diverses formes moléculaires (isoperoxydases) peuvent être séparées par électrophorèse sur gel d'amidon (Brewbaker et al., 1968) ou d'acrylamide (Ockerse et al., 1966; Lee, 1971a), par électrofocallisation (van der Mast, 1970b) et sur échangeur d'ions (Sequeira et Mineo, 1966).

Les plus étudiées sont celles de la racine de Raifort. On peut les classer en peroxydases cationiques et anioniques (Shih et al., 1971). Cette constatation est valable pour de nombreuses plantes, dont le Navet (Mazza et al., 1973). Les peroxydases de Raifort sont composées d'un seul peptide. Elles ne sont pas des isoenzymes sensu stricto, résultat de la combinaison d'un petit nombre de peptides différents, comme la lactate déshydrogénase par exemple. Toutefois, dans certains cas, elles peuvent se scinder en unités plus petites mais toujours fonctionnelles. Une température ou une force ionique élevées favorisent cette scission (Janssen, 1970 a et b). De ce fait, les conditions d'extraction jouent un rôle déterminant dans le nombre de peroxydases différentes obtenues à partir d'un même tissu. Le pH (Pilet et al., 1967; Gaspar et al., 1969a; Liu et Lamport, 1973), la force ionique (Addathody et Racusen, 1967), l'utilisation de détergent (de Jong, 1972) ou d'EDTA (MacNicol, 1973a) déterminent l'activité peroxydasique obtenue ainsi que le comportement électrophorétique des isoperoxydases.

Les peroxydases peuvent oxyder un grand nombre de phénols et d'amines aromatiques en présence de peroxyde. C'est d'ailleurs cette propriété qui a permis leur découverte, en partie dans notre département (Chodat et Bach, 1903). Beaucoup des substances phénoliques qui se trouvent dans les plantes et y jouent un rôle physiologique important sont oxydées ou mé-

tabolisées grâce aux peroxydases (Pickering et al., 1973; Young et Steel, 1973). Cette oxydation intervient à la suite de la fixation du groupement phénolique sur l'enzyme (Danner et al., 1973). En présence de quantités catalytiques de peroxyde d'hydrogène, les peroxydases peuvent favoriser l'incorporation d'oxygène dans certains polyphénols, tels les chalcones (Rathmell et Bendall, 1972). Mais les phénols et les amines ne sont pas les seules molécules auxquelles elles peuvent s'attaquer. Elles oxydent l'acide 3-indolylacétique (Kenten, 1955; Hare, 1964; Meudt, 1964; Hoyle, 1972), le tryptophane, la tyrosine et certains peptides (Saunders et al., 1964), les pyridines nucléotides réduites (NADH et NADPH) (Yokota et Yamazaki, 1965), le pyridoxal (Hill, 1970) et l'acide ascorbique (Chmielnicka et al. 1971). Elles participent à la biosynthèse de l'éthylène (Mapson et Wardale, 1972) et de la lignine (Freudenberg et al., 1952; Bowling et Cowden, 1973; Harkin et Obst, 1973). Elles agissent également, en présence d'un réducteur adéquat, comme des nitrate-⁻réductases (Peive et al., 1972; Ivanova et Peive, 1973). In vitro elles ont en général toutes les mêmes possibilités catalytiques. Cependant il est fréquent que deux peroxydases extraites d'un même tissu présentent des différences sensibles dans leur propriétés cinétiques et leur affinité avec certains substrats (Mazza et al., 1968; Evans, 1970; MacNicol, 1973b; Kamel et Ghazy, 1973). C'est ainsi que chez le Navet, la peroxydase la plus basique est la plus efficace dans le catabolisme auxinique en l'absence de peroxyde (Mazza, 1971). Une peroxydase cationique de Raifort est la seule à catalyser la synthèse de l'éthylène à partir du méthional (Yang, 1968). D'autre part, certaines peroxydases peuvent oxyder directement des donneurs d'électrons (par exemple l'AIA: Ricard et Nari, 1966), selon leur potentiel d'oxydo-réduction.

Dans de nombreuses réactions, elles activent l'oxygène en se combinant avec lui (composé III). Ce mécanisme est différent suivant le substrat oxydé (par exemple NADH ou AIA: Yamazaki et Yamazaki, 1973). Elles

présentent la particularité de consommer cet oxygène de façon oscillatoire. Ces oscillations, dues à leurs caractéristiques physicochimiques, sont rapidement amorties, à moins que le système ne soit entretenu en couplant la peroxydase avec une deshydrogénase (Strickland et Ackerman, 1966; Yamazaki et Yokota, 1967 et 1973). Elles se produisent aussi bien avec NADH et NADPH qu'avec l'AIA et dihydroxyfumarate (Degn, 1973). Il est intéressant de noter qu'elles sont durables lorsque la peroxydase est couplée à une enzyme aussi importante que la glucose-6-phosphate deshydrogénase (Nakamura et al., 1969). Cela suggère que certaines peroxydases pourraient jouer, à l'intérieur de la cellule, le rôle d'oscillateur endogène.

Les peroxydases sont présentes dans toutes les parties de la plante. Certaines régions (racines, épidermes, tissus conducteurs) peuvent être particulièrement riches, suivant les saisons ou leur âge physiologique. En général chaque organe a une distribution isoperoxydasique propre (Evans et Alldridge, 1965; Scandalios, 1969; Safonova et al., 1970; Kahlem, 1973). A l'intérieur des cellules, les peroxydases sont situées dans le cytosol (Wise et Morrison, 1971), dans les vacuoles (Hall et Saxton, 1972), les lysosomes (Pleniscar et al., 1967). Leur présence dans les peroxysomes (Poux, 1972), les mitochondries (Parish, 1972a et 1972b), les ribosomes (Penon et al., 1970; Penon, 1971; Darimont et Baxter, 1973) et les chloroplastes (Ivanova et al., 1969), ainsi que leur association aux chromosomes, aux nucléoles (Raa, 1973a) et aux ribonucléoprotéines (Matsushita et Ibuki, 1960) ne sont pas admises de façon unanime. Les techniques utilisées, réaction cytochimique avec la diamino-benzidine ou centrifugation différentielle, donnent des résultats sujets à contestation (manque de spécificité dans le premier cas et risques de contamination dans le second). En revanche l'association des peroxydases aux parois (Ridge et Osborne, 1970; Darimont et al., 1973) et aux membranes (Czaninski et Catesson, 1969; van der Mast, 1970e; Haard, 1973) ne fait pas de doute.

L'activité peroxydasique est dépendante d'un très grand nombre de facteurs. Elle est différente dans chaque organe d'une plante et varie dans celui-ci au cours de sa croissance et de sa différenciation. Généralement, les tissus très jeunes ont une activité assez forte qui diminue au cours du développement puis augmente lors du vieillissement (Kaminski, 1971; Birecka et al., 1972; de Jong, 1972; Sirju et Wilson, 1974). Cependant, l'évolution peut être différente, voire inverse comme dans les feuilles et le méristème d'Orge (Gupta et Stebbins, 1969). Ces variations d'activité s'accompagnent de remaniements du profil isoperoxydasique (Upadhyaya et Yee, 1968), liés peut-être à la différenciation cellulaire (Verma et van Huystee, 1970). Dans le cas d'une Orchidée étudiée par Alvarez et King (1969), les variations de l'activité totale sont dues avant tout aux peroxydases cationiques.

Les peroxydases peuvent être mises en relation avec d'autres processus physiologiques tels la dormance (Pooviah et al., 1972; Gaspar et al., 1973), l'abscission des feuilles (Pooviah et Rasmussen, 1973), le nanisme (Galston et Davies, 1969). Elles sont dépendantes de facteurs génétiques (Scandalios, 1969; Conklin et Smith, 1971; MacNicol, 1973b; Tyson, 1973) et, dans une certaine mesure, de la différenciation sexuelle (Maciejewska-Potapczjowa et al., 1972; Retig et Rudich, 1972; Bredemeijer, 1973). Des blessures, des infections virales ou microbiennes et la présence de parasites peuvent déclencher l'apparition de nouvelles formes moléculaires (Kanazawa et al., 1965; Stahman et Demorest, 1972).

Le contrôle du taux endogène en auxines peut être attribué en partie aux peroxydases, en raison de leur fonction auxine-oxydasique. Il existe une corrélation inverse entre les auxine-oxydases ou les peroxydases et la capacité de croissance des tissus (Galston, 1967) d'une part, et entre les auxines et les auxine-oxydases d'autre part (Pilet, 1967). Dans les tissus vieillissants, le taux en auxines diminue et l'activité peroxydasique augmente. Un traitement auxinique bloque cette évolution (Ockerse et

et al., 1966; Galston et Davies, 1969; Sirju et Wilson, 1974). Les auxines inhibent également certaines isoperoxydases qui apparaissent normalement lors de l'excision et la culture de tissus (Leshem et al., 1970; Leshem et Galston, 1971; Chourey et al., 1973). Des exemples d'apparition de nouvelles isoperoxydases sous l'effet de l'AIA ou du 2,4-D ont aussi été présentés (Ritzert et Turin, 1970). Il semble bien en effet que chaque groupe de peroxydases ait une sensibilité différente aux auxines et que les résultats soient dépendants de la quantité d'hormone appliquée (Stubber et Levings, 1969; Lee, 1971b et 1972; van Hoof et Gaspar, 1973).

D'autres hormones végétales peuvent modifier l'activité peroxydasique. Les gibberellines, qui ont généralement une action protectrice de l'auxine, inhibent l'activité peroxydasique et auxine-oxydasique dans de nombreux cas (Pilet, 1957; Halevy, 1963; Bouillenne-Walrand et al., 1967; Katsumi et Sano, 1968; Birecka et Galston, 1970). Parfois cependant elles n'ont pas d'effet (Varga et Balint, 1966) ou une action promotrice (Bolduc et al., 1970). L'éthylène, lui, accroît considérablement cette activité (Gahagan et al., 1968; Shannon et al., 1971; Morgan et Fowler, 1972; Birecka et al., 1973). Les cytokinines l'inhibent (Gaspar et al., 1973). Elles ont une action différente suivant leur concentration et l'isoperoxydase considérée (Lee, 1971a).

Mis à part la croissance, le développement, le vieillissement et les facteurs génétiques, hormonaux et sanitaires, les conditions du milieu dans lequel les plantes sont cultivées participent au contrôle de l'activité et de la répartition isozymique des peroxydases. Les températures basses favorisent généralement une forte activité. Certaines isoperoxydases apparaissent seulement à certaines températures de culture (de Jong et al., 1968; Tran Thanh Van et Trippi, 1968; Roberts, 1969). La durée, la qualité et la quantité de lumière reçue par la plante jouent un rôle important dans l'état des peroxydases. L'activité de l'une d'entre elles, qui se trouve dans le chloroplaste, peut être modifiée directement par la lumière (Iva-

nova et al., 1970). La réaction de cette activité à différentes longueurs d'onde suggère que la photosynthèse pourrait intervenir dans son contrôle (Benedict, 1971). D'autre part, la durée du jour agit de façon différentielle sur les isoperoxydases de Citrus, Poncirus et Nicotiana tabacum (Warner et Upadhy, 1968; de Jong, 1973). La réponse des peroxydases est différente suivant les organes (Parish, 1969; Schopfer et Plachy, 1973). L'activité auxine-oxydasique suit en général la même évolution. Dans ce cas, la participation d'effecteurs positifs ou négatifs a été mise en évidence par de nombreux auteurs (Garay et al., 1959; Watanabe et Stutz, 1960; Sagi et Garay, 1961; Engelsma et Meijer, 1965). Ces effecteurs sont contrôlés par le phytochrome (Hillman et Galston, 1957). La biosynthèse des peroxydases est aussi dépendante de ce pigment, comme celle de nombreuses autres enzymes (Schopfer, 1972a, 1972b et 1973). Il agirait sur les chromosomes et la synthèse des protéines (Mohr, 1966).

II. BUT DU TRAVAIL ET PLAN EXPERIMENTAL

Notre but, au début de ce travail, était l'étude d'une enzyme, en l'occurrence la peroxydase de feuilles d'Epinard, en fonction de la floraison de cette plante. Nous avons choisi les peroxydases parce que ce sont elles qui contrôlent en partie le taux en auxine (Galston, 1967), soit en la détruisant (Pilet et Gaspar, 1968), soit même en participant à sa biosynthèse (Riddle et Mazelis, 1964). Or, dans plusieurs cas, on a montré que le taux en auxine endogène libre subit une baisse importante lorsque la plante est sur le point de fleurir (Cooke, 1954; Gilson, 1957; Moore et Hough, 1962). D'autre part, l'application d'auxines retarde ou supprime la floraison de nombreuses plantes (Lang, 1965). Enfin, les Epinards présentent des différences dans leur métabolisme auxinique, selon qu'ils sont induits ou non (Konishi, 1956 et 1970). Toutes ces raisons justifient, nous semble-t-il, le choix que nous avons opéré.

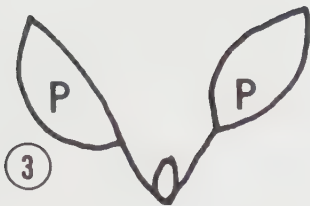
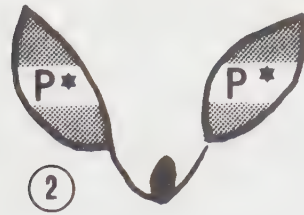
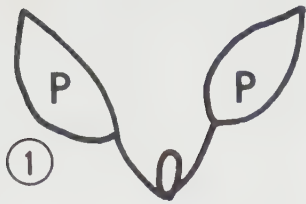
Les investigations nécessaires pour aborder le problème de l'association des peroxydases à l'induction florale ont été résumée à la figure 1. Le critère d'induction de la plante est l'état de l'apex (végétatif, évoqué ou floral)*. Lorsque l'apex est évoqué, les feuilles sont obligatoirement induites, puisqu'elles sont indispensables, comme récepteurs photopériodiques, à son évocation.

Il est logique de commencer par étudier les peroxydases de feuilles d'Epinards cultivés en jours courts (conditions non inductrices de florai-

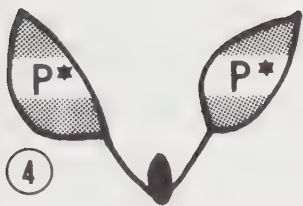
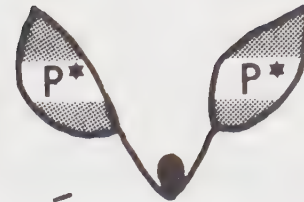
* Il a été étudié par G. Auderset (1974) dans notre laboratoire et nous nous référerons souvent à ses résultats au cours de ce travail.

JOURS COURTS

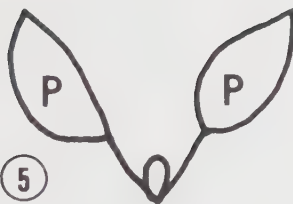
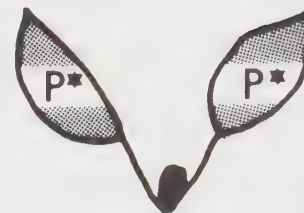
LUMIERE CONTINUE



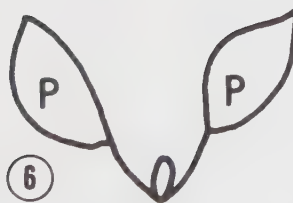
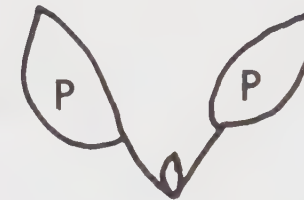
Transfert en
lumière continue



Induction
mimée



Transfert
+ DCMU



AG
↓
Ach
ou



feuille non induite



feuille induite



apex végétatif



apex évoqué
ou floral

P/P*

peroxydases

AG

acide gibberellique

Ach

acétyl-choline

DCMU dichlorophényl - diméthyl - urée

Figure 1.

son) et en jours continus (conditions inductrices. Fig. 1: n° 1 et 2). Si les peroxydases dans ces deux conditions présentent des différences soit d'activité, soit de composition isozymique, ou encore de sensibilité à certains agents (substances chimiques ou lumière rouge lointain), l'étape suivante consistera à étudier l'influence qu'a sur elles le transfert de conditions non inductrices en conditions inductrices (fig. 1: n° 3). Il est évident que les différences éventuellement observées entre les peroxydases de plantes cultivées en jours courts et celles de plantes cultivées en jours continus peuvent être dues uniquement à la différence de photopériode (effet photopériodique) et n'avoir aucun lien avec la floraison. Les expériences 4, 5, et 6 de la figure 1 sont destinées à préciser le degré de liaison des peroxydases et de la floraison.

Dans l'expérience 4, des plantes induites sont replacées en jours courts, où elles conservent leur aptitude à fleurir. Lors d'un second transfert (induction mimée) en lumière continue, les peroxydases de ces plantes, dans le cas d'une corrélation avec la floraison, ne devraient pas réagir comme lors d'un premier transfert, c'est à dire que les expériences 3 et 4 ne donneraient pas le même résultat. Cela signifierait que les peroxydases font partie du mécanisme de l'induction dans la feuille et ont été modifiées une fois pour toutes par le premier transfert en même temps que la plante acquerrait la faculté de fleurir. De plus, en cas de corrélation entre les peroxydases et la floraison, un inhibiteur qui bloque l'induction florale des plantes de jours longs, comme le DCMU (Bavrina et al., 1969), devrait empêcher les modifications observées au niveau des peroxydases lors du transfert lorsqu'il n'y a pas d'inhibiteur (expérience n° 5).

Enfin, des substances qui sont connues pour promouvoir l'apparition de l'évocation florale de l'apex en conditions non inductrices (acide gibberellique: Lang, 1965; acétylcholine: Greppin et al., 1973; Auderset, 1974) devront, parallèlement, induire les modifications de l'activité pe-

roxydasique produites normalement par le transfert en conditions inductrices (expérience n° 6).

Si les conditions précédentes sont remplies, on pourra dire qu'il y a un "état induit des peroxydases", caractérisé par un ensemble de réponses physiologiques spécifiques et que cet état est en corrélation avec l'induction florale ou du moins que ses conditions d'apparition sont strictement parallèles à celle de la floraison. Cet état des peroxydases est symbolisé par P^* dans la figure 1. L'étude de la cinétique de son apparition après le transfert en lumière continue, comparée à celle de l'évocation de l'apex, sera importante. Comme cette dernière est une conséquence de ce qui se passe dans les feuilles, on devrait observer les premiers signes de transformation de l'activité peroxydasique dans les feuilles avant que ne soit perceptible le changement de fonctionnement du méristème apical.

Cette étude de l'évolution d'une activité enzymatique en parallèle avec celle de l'induction florale procède de la même démarche expérimentale que la comparaison des rythmes d'aptitude à fleurir et de différents processus physiologiques entreprise sur *Chenopodium* par Cumming (1971).

III. MATERIEL ET METHODES

III. 1. CULTURE DES PLANTES

Les Epinards (*Spinacia oleracea*) utilisés pour cette étude sont de la variété Nobel. Les plantes ont été sélectionnées à la Station Expérimentale de Botanique de l'Université de Genève, afin d'éliminer les intersexuées et celles dont la floraison est trop précoce ou trop tardive et d'obtenir une certaine uniformisation de leur réponse individuelle aux différents traitements qu'elles subissent. Nous utilisons que les akènes produits à la Station.

Les Epinards sont des plantes de jours longs; ils sont cultivés:

- a) dans des serres à la lumière du jour et éclairés la nuit avec des lampes à incandescence Philips de 300 watts et des tubes fluorescents Sylvania "daylight" (4000 lux); la température est comprise entre 18 et 25⁰ C (plantes cultivées en jours longs);
- b) dans des enceintes fermées et ventilées, sous des tubes fluorescents Sylvania "daylight" (4000 lux) pendant 8 heures par jour (8 h - 16 h: lumière/16 h - 8 h: obscurité), la température est comprise entre 20 et 25⁰C (plantes cultivées en jours courts);
- c) dans les cabines du phytotron, dans les mêmes conditions d'éclairement que b, avec une température contrôlée de 20⁰ C et un degré d'humidité de 90 % (plantes cultivées en jours courts).

Dans les cas b et c, l'induction photopériodique des plantes cultivées en jours courts se fait simplement en les laissant continuellement

éclairées (transfert en lumière continue). Il n'y a pas de différences qualitatives au niveau des critères utilisés entre les plantes de jours courts cultivées en phytotron et celles cultivées dans de simples enceintes. Les premières présentent cependant une meilleure homogénéité dans leur croissance et leur niveau d'activité enzymatique.

Les Epinards sont d'abord semés, puis les plantules sont repiquées après une semaine dans du terreau préparé de façon standardisée à la Station de Botanique (2/3 de terreau de feuilles d'une année - 1/3 d'un mélange de tourbe et de terre franche). Les plantes sont arrosées une fois par semaine avec de l'engrais complet Lonzin en solution de 1/1000.

III. 2. TRAITEMENTS

Les produits suivant sont utilisés: l'acide gibberellique (GA_3 , Fluka), l'acétylcholine (Fluka), la 3-(3,4-dichlorophényl)-1,1-diméthylurée (DCMU, K & K Laboratories). Ils sont vaporisés sur les plantes en solution aqueuse, dans des concentrations précisées dans chaque cas.

La source de lumière rouge lointain (RL) utilisée est une lampe à incandescence Philips IR 250 W. Un filtre en Plexiglas bleu (Röhm et Haas, Darmstadt) placé juste au dessus des plantes permet d'arrêter les longueurs d'onde inférieures à 700 nm (fig. 2). Les intensités différentes sont obtenues en déplaçant la lampe. Sauf dans quelques cas, les plantes ne sont jamais exposées plus de 2 minutes, afin d'éviter un échauffement indésirable.

La source de lumière rouge (R) est un tube fluorescent Philips TL 20W/15 (fig. 3). Le rayonnement à 730 nm émis par celui-ci est négligeable. Les éclairagements sont mesurés à l'aide d'un spectroradiomètre ISCO. La manipulation des plantes et la préparation des extraits sont effectuées en lumière verte (tube Philips TL 20W/17). Sauf indication contraire, les feuilles sont broyées 3 minutes après la fin du traitement lumineux.

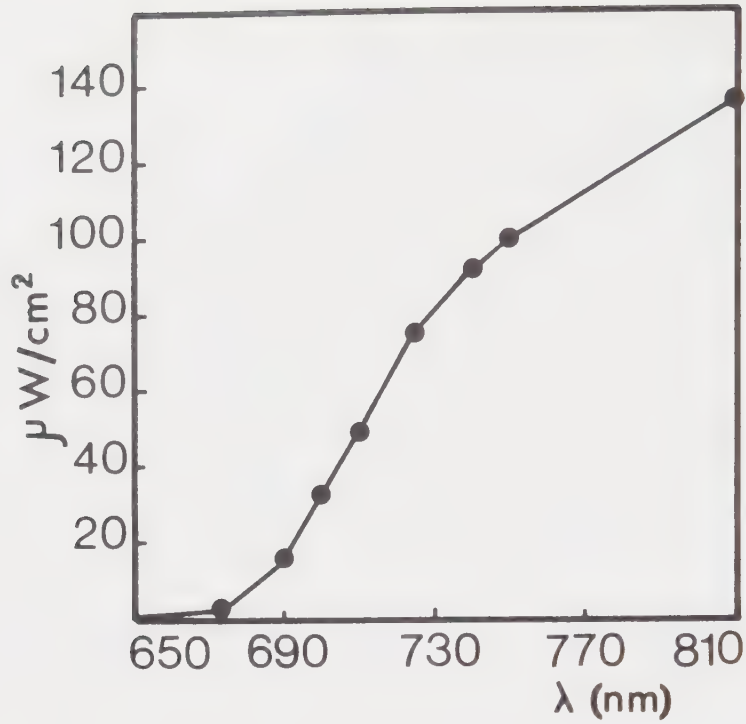


Fig. 2. Spectre d'émission de la lampe à incandescence Philips IR 250 watts, après filtration de son rayonnement par un Plexiglas bleu Röhm et Haas (mesures effectuées à 50 cm de la lampe).

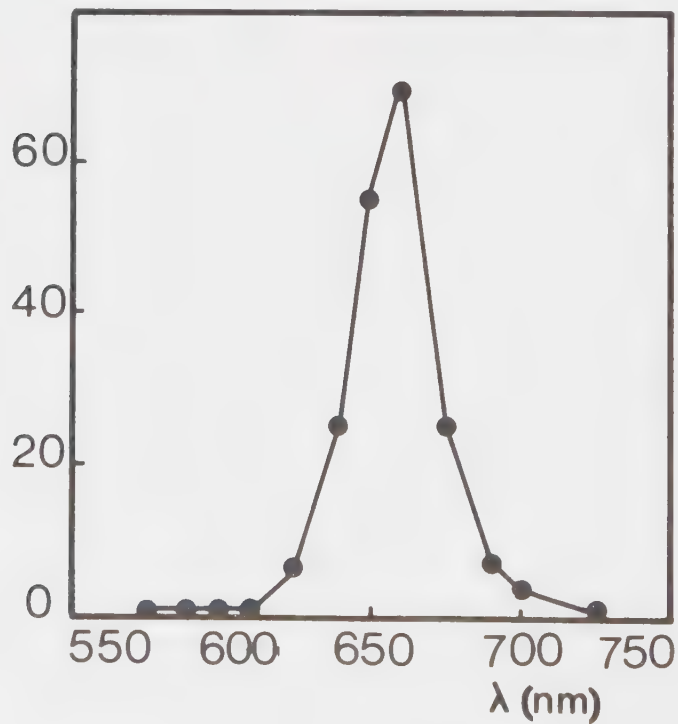


Fig. 3. Spectre d'émission du tube fluorescent Philips TL 20W/15 rouge (mesures effectuées à 20 cm du tube).

III. 3. DOSAGES

Le dosage des protéines est effectué soit selon la méthode de Lowry et al. (1951), soit selon celle de Hartree (1972) pour les petites quantités. Les courbes d'étalonnages sont données aux figures 4 et 5.

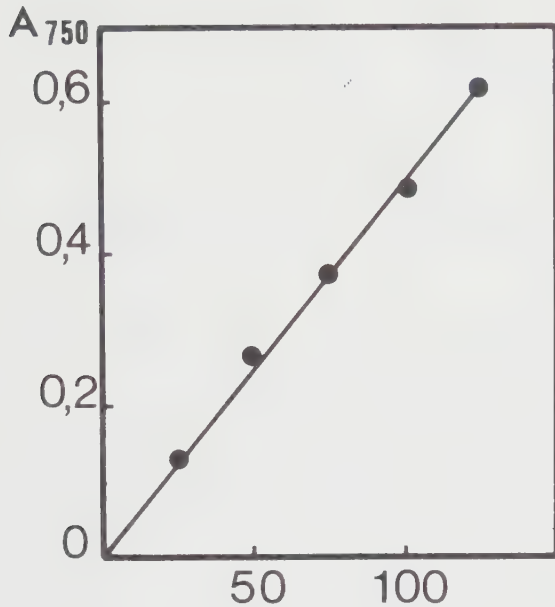


Fig. 4.

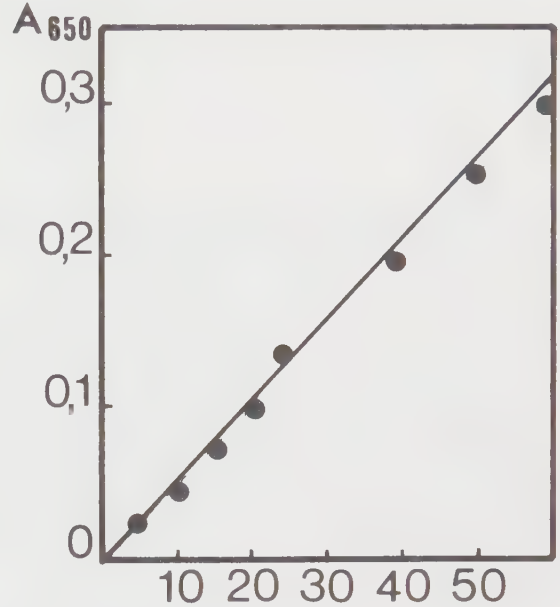


Fig. 5.

Dosage des protéines selon Lowry et al. (fig. 4) et selon Hartree (fig. 5). Courbes d'étalonnage réalisées avec de la Bovine Serum Albumine.

Les AIA-oxydases sont dosées selon Pilet et Collet (1962). L'utilisation dans cette méthode d'un cofacteur tel que le 2,4-dinitrophénol fausse probablement la capacité AIA-oxydasique de chaque isoperoxydase et ne permet pas de connaître le comportement direct de celle-ci vis-à-vis de l'acide indolylacétique. Il faudrait, pour éviter l'emploi de ce cofacteur, préparer plus d'enzyme que cela n'est le cas dans notre travail.

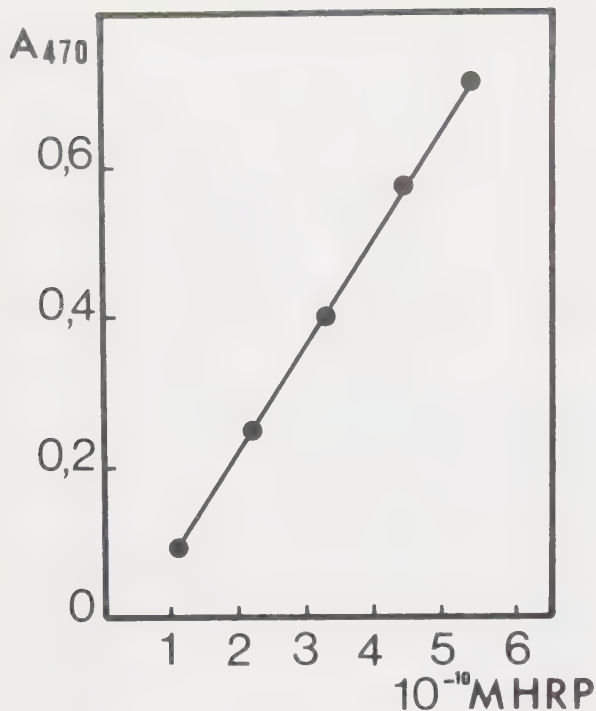


Fig. 6. Dosage des peroxydases avec le gaïacol. Courbe d'étalonnage en fonction de la concentration de peroxydase de Raifort dans le milieu de réaction.

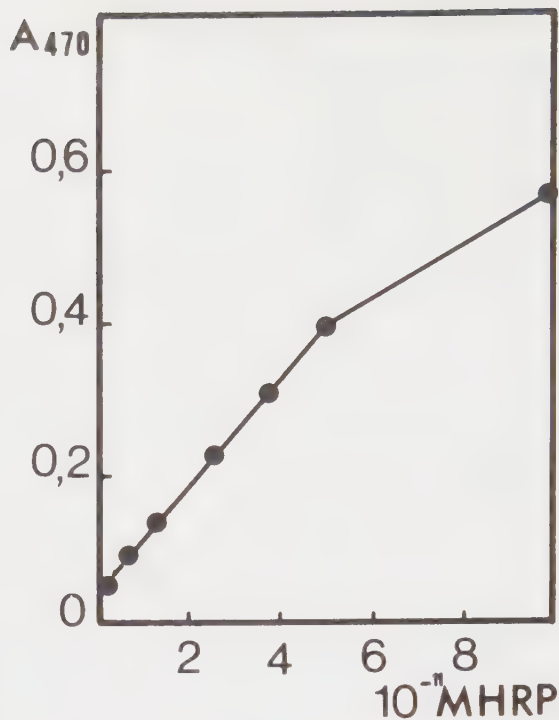


Fig. 7. Dosage des peroxydases avec l'o-dianisidine. Courbe d'étalonnage en fonction de la concentration de peroxydase de Raifort dans le milieu de réaction.

Les peroxydases sont dosées soit avec le gaïacol (Merck):

0,1 ml échantillon
 3,0 ml tampon phosphate (Na/K) 0,066 M, pH 6,1
 1,0 ml gaïacol 0,5 %
 1,0 ml H_2O_2 0,25 %

soit avec de l'ortho-dianisidine (Merck):

0,1 ml échantillon
 3,0 ml tampon phosphate (Na/K) 0,066 M, pH 6,1
 1,0 ml o-dianisidine (60 mg dans éthanol 70 ml
 tampon acétate pH 5 30 ml.
 0,1 ml H_2O_2 0,25 %

Dans les deux cas, l'incubation a lieu à l'obscurité.

L'absorption est lue après 30 minutes à 470 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre Hitachi modèle 101.

Des courbes d'étalonnage avec la peroxydase de Raifort (HRP, Fluka) donnent une idée des quantités de peroxydases auxquelles correspondent les densités optiques (fig. 6 et 7).

L'activité peroxydasique est exprimée en absorption à 470 nm (A_{470}) formée en 30 minutes et par milligramme de protéines (ou par unité de poids frais) lors de la réaction avec le gaïacol.

III. 4. EXTRACTION DES PEROXYDASES TOTALES

D'une façon générale, l'extraction des enzymes de tissus végétaux présente des difficultés en raison de la présence de substances phénoliques qui peuvent se combiner aux protéines. Cette association protéines-phénols peut être due à la formation de liaisons hydrogène, mais souvent les phénols sont oxydés dans l'extrait en quinones très réactives vis-à-vis des protéines (Pierpoint, 1969a et 1969b). Alors que l'association protéines-phénols est réversible, la formation de liaisons covalentes entre les protéines et les quinones est irréversible (Loomis et Battaille, 1966). La formation de quinones est favorisée à pH légèrement alcalin et les liaisons hydrogène à pH acide (Fieldes et Tyson, 1973).

Il faut éliminer les phénols le plus tôt possible lors de l'extraction d'enzymes, afin d'éviter une dénaturation de celles-ci, voire même une modification de leur caractéristiques physico-chimiques (p. ex. mobilité électrophorétique). Dans le cas des peroxydases ou des auxine-oxydases, il faut prendre garde, en plus, au fait que la plupart de ces substances sont des effecteurs positifs ou négatifs. Enfin, elles réagissent avec le réactif de Folin-Ciocalteu utilisé dans le dosage des protéines et faussent de ce fait les mesures.

Le polyvinylpyrrolidone (PVP) est un polymère qui possède la propriété de capter les phénols en formant avec eux des liaisons hydrogène. L'addition de ce polymère au moment du broyage des tissus permet de protéger partiellement les protéines, mais ce procédé est surtout efficace à pH acide (Jones et al., 1965; Andersen et Sowers, 1968). Une résine Dowex échangeuse d'anions semble plus efficace que le PVP (Lam et Shaw, 1970). Dans ce travail, nous utiliserons le PVP dans tous les procédés d'extraction, à l'exception de celui des protéines basiques où le pH est suffisamment élevé pour prévenir la formation de liaisons hydrogène ou de quinones en grandes quantités.

Les peroxydases totales sont mesurées dans les feuilles adultes intactes et non sénescentes (au moins 2,5 cm de longueur). Ces feuilles sont numérotées selon leur ordre d'apparition (feuilles 1 et 2: premières apparues et situées au bas de la plante, puis feuilles 3 et 4, etc.). Généralement, dans une plante de 4 feuilles, le dosage est effectué sur les feuilles 1 et 2; dans une plante de 6 feuilles, sur les feuilles 3 et 4; dans une plante de 8 feuilles, sur les feuilles 3, 4 et 5. Ces feuilles sont broyées dans un mortier à 4° C. On utilise 10 ml de tampon phosphate 0,066 M, pH 7, et 1,5 g de PVP insoluble (Polyclar AT) par gramme de poids frais. Ce polymère, qui permet donc d'éliminer une partie des substances phénoliques, a été préalablement lavé dans HCl 10 % et de l'eau distillée. Après filtration, l'extrait est centrifugé à 10000g pendant 10 min. Les peroxydases sont dosées avec le gaïacol. Les résultats sont ramenés au poids frais ou au milligramme de protéines (Lowry).

III. 5. SEPARATION DES PEROXYDASES SUR GEL SEPHADEX

Les feuilles adultes de plusieurs épinards sont congelées et broyées dans un mortier en présence de glace carbonique. La poudre obtenue est agitée pendant une heure dans un tampon phosphate 0,066 M, pH 7 (10 ml par gramme de poids frais), contenant 1,5 g de PVP insoluble par g de poids frais. Après filtration et centrifugation (10000g) pendant 10 min, l'extrait est concentré soit par précipitation des protéines avec du sulfate d'ammonium en solution saturée, soit par ultrafiltration sous pression (Millipore, Pellicon type PS). Dans le premier cas, le précipité protéique est recueilli par centrifugation et dialysé une nuit contre 2 litres de tampon phosphate pH 7.

L'extrait concentré est filtré sur une colonne de Sephadex G25 de 45x2,5 cm. Les protéines ainsi débarassées des molécules de plus petit poids moléculaire sont à nouveau concentrées comme ci-dessus. L'extrait purifié obtenu est alors amené à pH 5,4 par dialyse contre un tampon à ce pH et introduit dans une colonne de 1,5 cm de diamètre contenant 60 cm de gel Sephadex G100 sur lequel ont été placés 15 ml d'échangeur de cations SE- Sephadex C50. Les deux gels sont séparés par une membrane Sartorius. L'échangeur d'ions est équilibré dans un tampon phosphate 0,066 M, pH 5,4, le gel G100 dans un tampon phosphate 0,066 M, pH 7. L'élution est faite à pH 5,4. Les fractions recueillies ont 2 ml. Au bout de 30 fractions, on ajoute du chlorure de sodium 0,2 M à l'éluant. Toutes ces opérations sont conduites à 4⁰ C. Les activités peroxydasiques sont dosées dans chaque fraction avec le gaïacol. Le temps d'incubation pour les AIA-oxydases est de 2 heures.

III. 6. SEPARATION DES PEROXYDASES SUR GEL D'ACRYLAMIDE

Les feuilles adultes d'Epinaud sont broyées au mortier. On ajoute ensuite 2 g de PVP insoluble et 4 ml de tampon phosphate 0,066 M, pH 7, par g de poids frais. Après filtration et centrifugation (10000g) pendant 10 min, les protéines sont dosées dans chaque extrait (Lowry). On utilise 250 mg de protéines par gel. L'électrophorèse est effectuée selon Davis (1964). Le gel supérieur (10 mm) contient 2,5 % de polyacrylamide et son pH est de 6,8. Le gel inférieur (150 mm) contient 7,5 % de polyacrylamide et son pH est de 4,3 (KOH- ac. acétique). La tension appliquée est de 800 volts pendant 8 heures (8 mA par gel).

Les peroxydases sont révélées dans un mélange benzidine- H_2O_2 à pH 6,1. Après fixation dans de l'acide acétique dilué, les gels sont passés dans un photomètre qui mesure l'intensité de coloration de chaque bande. Un enregistrement du profil de celle-ci permet une comparaison entre chaque expérience.

III. 7. SEPARATION DES PEROXYDASES PAR ELECTROFOCALISATION

Les feuilles adultes d'Epinaud sont broyées dans un mortier à 4° C. On ajoute 5 ml de tampon phosphate 0,066 M, pH 7, par gramme de poids frais. Après centrifugation à 10000g pendant 10 min, l'extrait est filtré dans une colonne de Sephadex G 25 équilibré dans de l'eau distillée. Cela permet d'obtenir des protéines débarassées des petites molécules et notamment des sels indésirables lors de l'électrofocalisation. On utilise 15 mg de ces protéines (Lowry) pour l'électrofocalisation (isoelectric focusing) qui est effectuée dans une colonne LKB de 110 ml, selon les indications du constructeur. Le gradient de densité est construit avec du saccharose (0-45 %

poids/volume). L'ampholine utilisée en concentration maximum de 2,5 % donne un gradient de pH compris entre 3 et 10. De l'urée est ajoutée de façon à avoir dans la colonne une concentration homogène de 6M. Elle permet d'éviter une précipitation des protéines dans la zone acide. Le voltage appliqué est de 300 volts, pour un courant initial de 1 mA. La séparation dure 72 heures à 4° C. Le contenu de la colonne est ensuite élué en fractions de 2 ml.

Le pH de l'éluat est mesuré à flot continu avec une électrode Beckman (n° 39013), l'absorption à 280 nm avec un Uvicord LKB. L'activité peroxydasique est dosée dans chaque fraction en utilisant l'o-dianisidine. L'importance relative des peroxydases acides et des peroxydases basiques est estimée en mesurant le poids des pics respectivement de pH 4 à 7 et de pH 7 à 11,5, découpés dans du papier calque. Les valeurs sont exprimées en absorption à 470 nm.

III. 8. SEPARATION ET DOSAGE DES PEROXYDASES BASIQUES

Les feuilles adultes de 2 à 5 épinards sont broyées dans une solution de Na_2CO_3 0,05 M et de NaCl 0,05 M à l'aide d'un Ultraturrax. L'extrait est rapidement centrifugé (10000g pendant 10 min) et filtré. On ajoute ensuite 4 ml de celui-ci à 14 ml de Na_2HPO_4 0,1 M contenant une quantité standard d'échangeur de cations CM Sephadex C50 (pH 9,2). Après 15 min d'agitation la résine est filtrée, lavée et reprise dans 2 ml de Na_2HPO_4 0,1 M/NaCl 1M. Les protéines ainsi obtenues sont dosées par la méthode de Hartree, les peroxydases avec le gaïacol. L'activité est exprimée en absorption à 470 nm/30 min/mg protéines. L'écart entre les valeurs de deux dosages effectués sur deux extractions simultanées est de 4 % au maximum. L'activité des peroxydases basiques dépend du pH de séparation sur CM Sephadex (fig. 8). L'emploi de PVP soluble pour éliminer les substances

phénoliques aboutit dans ce cas à une diminution de l'activité après séparation (fig. 9).

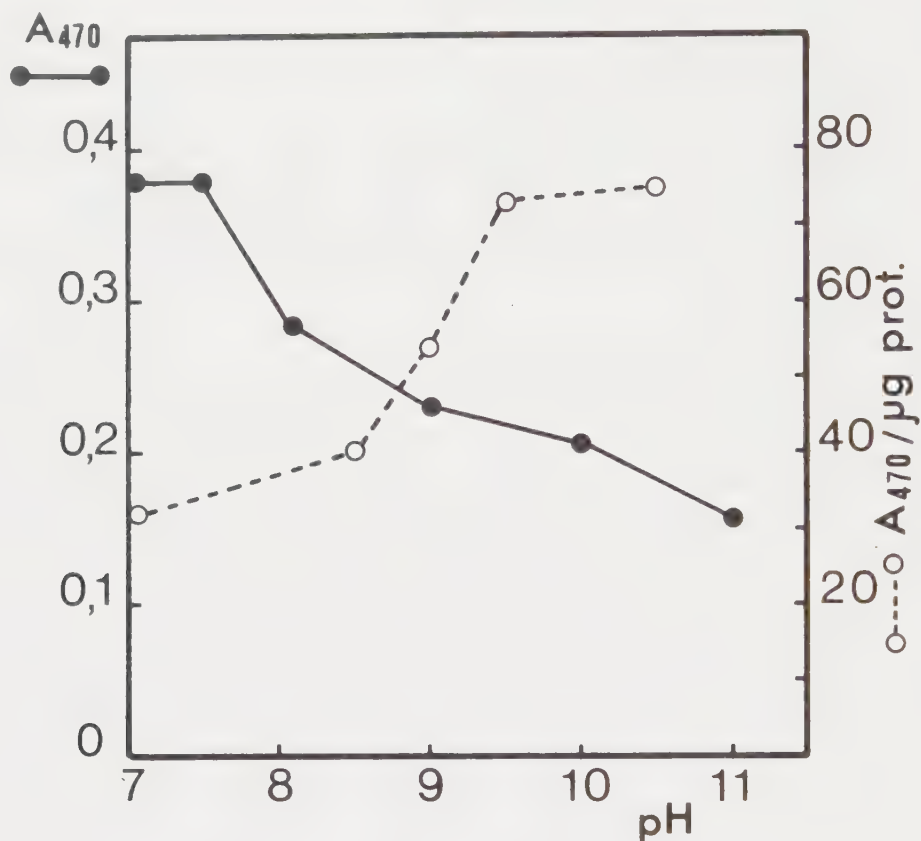


Fig. 8. Effet du pH lors de la séparation de peroxydases basiques sur CM Sephadex C50 à partir d'ali-
quots d'un même extrait. Les peroxydases sont dosées
avec le gaïacol à 470 nm.

III. 9. PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES PEROXYDASES BASIQUES

Les peroxydases basiques (0,5 ml d'extrait correspondant à 1,5 g de poids frais) sont filtrées dans une colonne Sephadex G100 (50x1,2 cm) équilibrée avec du tampon phosphate 0,1 M, pH 7, pour apprécier leur homogénéité. Du chlorure de sodium (0,4 M) est ajouté dans le tampon pour éviter une adsorption des protéines sur la résine. On recueille des fractions de 1 ml.

La cinétique d'oxydation du gaïacol est mesurée selon la méthode indiquée au § III. 3. Les concentrations croissantes de substrat sont de $3,2 \cdot 10^{-4}$ à $2,4 \cdot 10^{-2}$ M. Les effecteurs sont ajoutés en concentration finale de $2 \cdot 10^{-6}$.

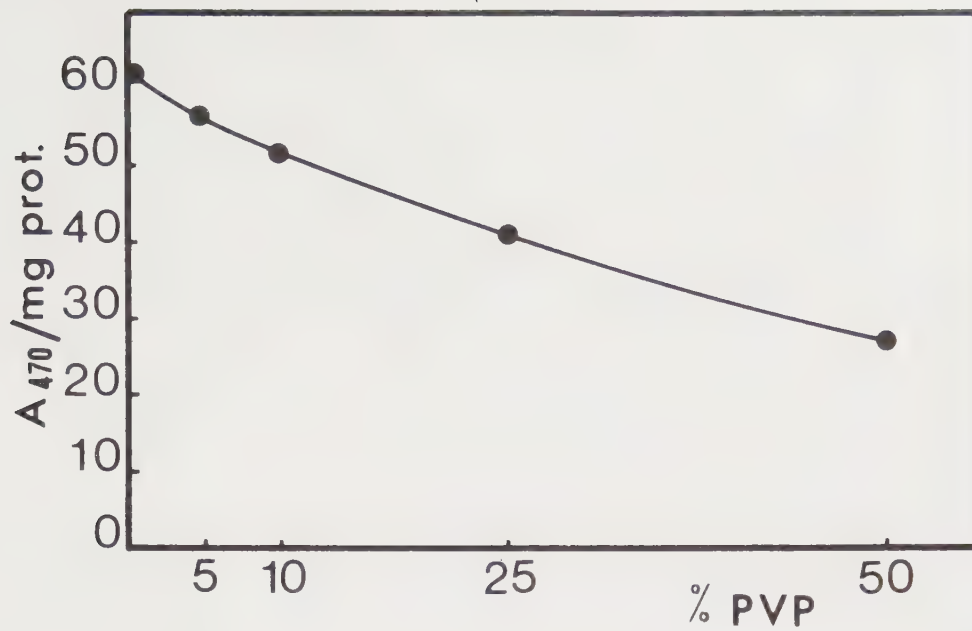


Fig. 9. Effet du PVP soluble sur l'activité des peroxydases basiques. La quantité de PVP ajoutée dans des aliquots d'un même extrait est exprimée en % du poids frais.

IV. ETUDE DES PEROXYDASES D'EPINARDS CULTIVES EN JOURS COURTS

IV. 1. PEROXYDASES TOTALES

Résultats

Les épinards cultivés en jours courts reçoivent la lumière de 8 heures le matin à 16 heures l'après-midi. L'alternance jour-nuit s'accompagne de variations journalières de l'activité des peroxydases des feuilles extraites à pH7 (tableau I). Le rythme est évident, que l'on exprime la densité optique obtenue par réaction avec le gaïacol par rapport au milligramme de protéine ou à l'unité de poids frais. Il est gouverné par la photopériode et disparaît en lumière continue (voir chapitre VI). Il s'agit donc d'un exorythme. Cependant il n'est pas impossible que les peroxydases, ou certaines d'entre elles, possèdent un rythme d'activité qui leur soit propre (endorythme). Ce dernier apparaîtrait dans des conditions de culture constante. Il n'a pas été recherché dans ce travail. L'activité des peroxydases basiques peut d'autre part présenter des oscillations. La modulation de l'activité des peroxydases par la photopériode est perturbée dans les feuilles sénescentes (plus de 2 ou 3 semaines d'existence). Elle peut même être inversée (tableau II). Les AIA-oxydases, qui ne sont probablement qu'une fonction des peroxydases (voir § IV. 2. 1.), suivent la même évolution, sans qu'il y ait un parallélisme parfait dans le comportement des deux activités.

TABLEAU I. DOSAGES DES ACTIVITES PEROXYDASIQUES ET DES PROTEINES A DIFFERENTS MOMENTS DU CYCLE JOURTS COURTS-NUITS LONGUES.

	Heure	$\mu\text{g prot.}$ $\frac{\quad}{100 \text{ mg PF}}$	A_{470} $\frac{\quad}{100 \text{ mg PF}}$	A_{470} $\frac{\quad}{\text{mg prot.}}$
a) Peroxydases totales (extraites à pH 7)				
Début 35 ^e JC	8	1160	3,30	2,83 ($\pm 0,20$)
Fin 35 ^e JC	16	1360	2,90	2,13 ($\pm 0,15$)
Milieu de la nuit	24	1450	3,78	2,60 ($\pm 0,22$)
b) Peroxydases basiques (extraites à pH 10,5)				
Début 42 ^e JC	8	2,0	0,166	83,0 ($\pm 4,2$)
Fin 42 ^e JC	16	2,8	0,160	57,2 ($\pm 2,5$)
Milieu de la nuit	24	3,5	0,220	62,8 ($\pm 2,0$)

Chaque valeur est la moyenne de 6 dosages.

Le tableau II montre également qu'avec le vieillissement de la feuille, l'activité des peroxydases augmente. On peut constater (fig. 10) que l'âge physiologique des feuilles n'est cependant pas le seul facteur qui permet d'expliquer le niveau moyen de leur activité peroxydasique. L'âge de la plante a également son importance, ce qui se traduit par une certaine égalisation de l'activité des diverses paires de feuilles adultes d'une même plante. Chaque paire de feuilles voit son activité croître au cours du temps, mais il y a peu de différences entre les paires de feuilles, quel que soit leur âge. Cela semble indiquer une coordination de l'activité enzymatique entre les feuilles d'une même plante. Cette coordination pourrait être assurée par l'apparition d'un régulateur de cette activité dont la répartition serait uniforme dans toute la plante.

D'autre part, les peroxydases dans les feuilles adultes et non sénescentes présentent une évolution caractéristique au cours de la vie des Epinards en jours courts. Leur activité diminue jusqu'à ce que la plante ait 4 feuilles, après quoi elle augmente (fig. 11).

TABLEAU II. EVOLUTION DES ACTIVITES PEROXYDASIQUE (P: $A_{470}/100$ mg PF) ET AIA-OXYDASIQUE (AO: μ g AIA détruits/100 mg PF/2 heures) EXTRAITES A pH 7 DANS DES FEUILLES DE SPINACIA PRELEVEES AU DEBUT (d), AU MILIEU (m) ET A LA FIN (f) DU JOUR COURT.

		Plantes de 6 feuilles		Plantes de 8 feuilles		Plantes de 12 feuilles	
		P	AO	P	AO	P	AO
Feuilles 1+2	d	3,0	19	-	-	-	-
	m	4,5	34				
	f	5,0	22				
Feuilles 3+4	d	4,6	31	5,0	45	6,4	26
	m	3,7	32	5,8	31	6,2	35
	f	3,0	24	5,0	19	8,8	50
Feuilles 5+6	d	-	-	6,4	33	5,3	40
	m			5,7	32	6,0	32
	f			4,2	17	6,4	30

Discussion

Le niveau d'activité des peroxydases totales évolue en fonction de plusieurs paramètres. On peut en discerner en tous cas trois: l'alternance lumière-obscurité, l'âge physiologique des feuilles et l'âge de la plante. L'augmentation d'activité dans un tissu au cours de son vieillissement est

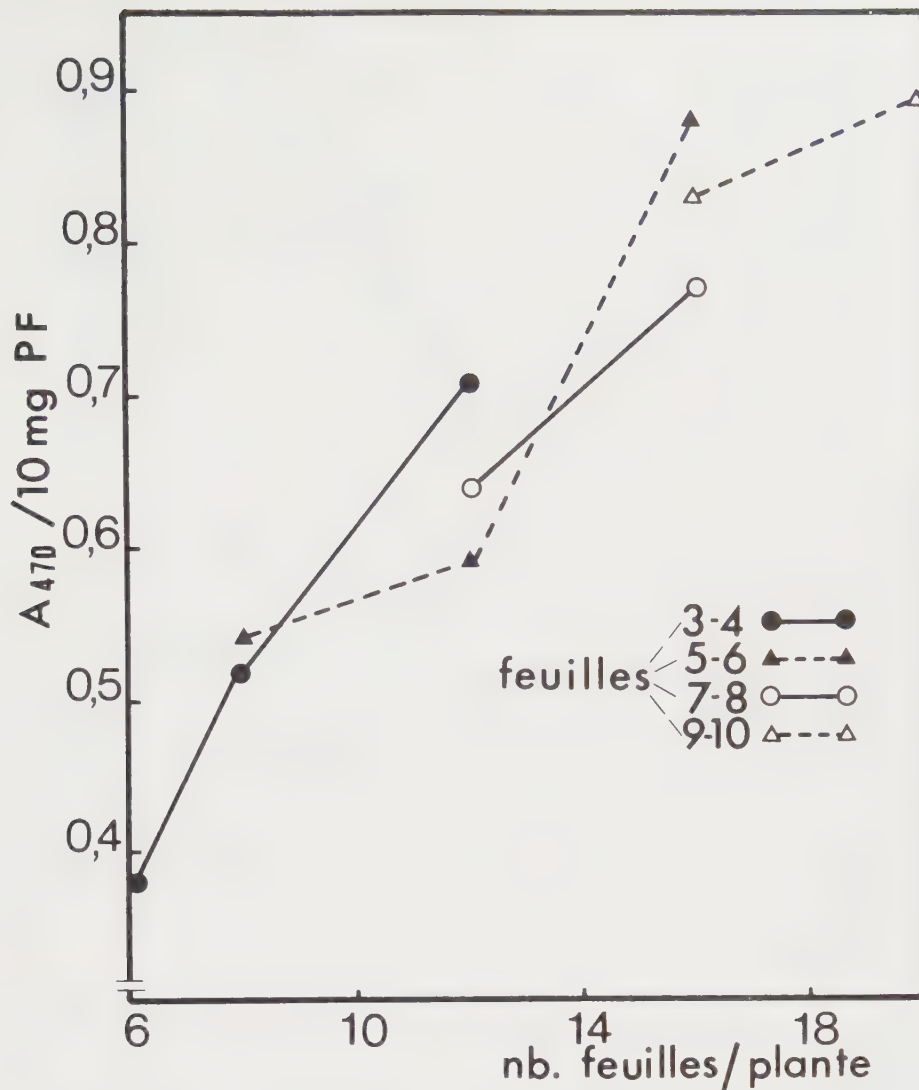


Fig. 10. Evolution de l'activité peroxydasique totale (extraite à pH 7) dans certaines paires de feuilles en fonction du stade de développement de *Spinacia* (nombre de feuilles par plante). Les feuilles sont numérotées selon leur ordre d'apparition sur la plante. Chaque point représente la moyenne de 3 dosages effectués au début, au milieu et à la fin du JC.

déjà connu par de nombreux exemples (Hare, 1964; Birecka et Galston, 1970), de même que l'évolution des peroxydases au cours de la vie d'une plante (voir chapitre X). Le minimum d'activité constaté dans les Epinards de 4 feuilles pourrait correspondre à un événement physiologique tel que la modification de fonctionnement de l'apex qui a alors formé plus d'une dizaine de feuilles (fig. 12) et qui cesse d'être purement végétatif (Aunderset, 1974). On sait que souvent un méristème ne peut passer de l'état

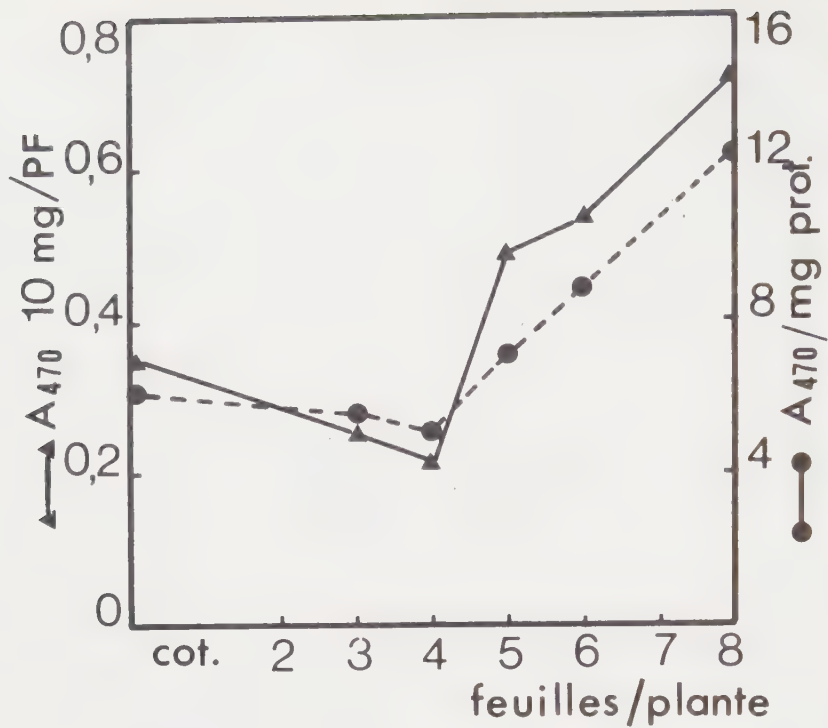
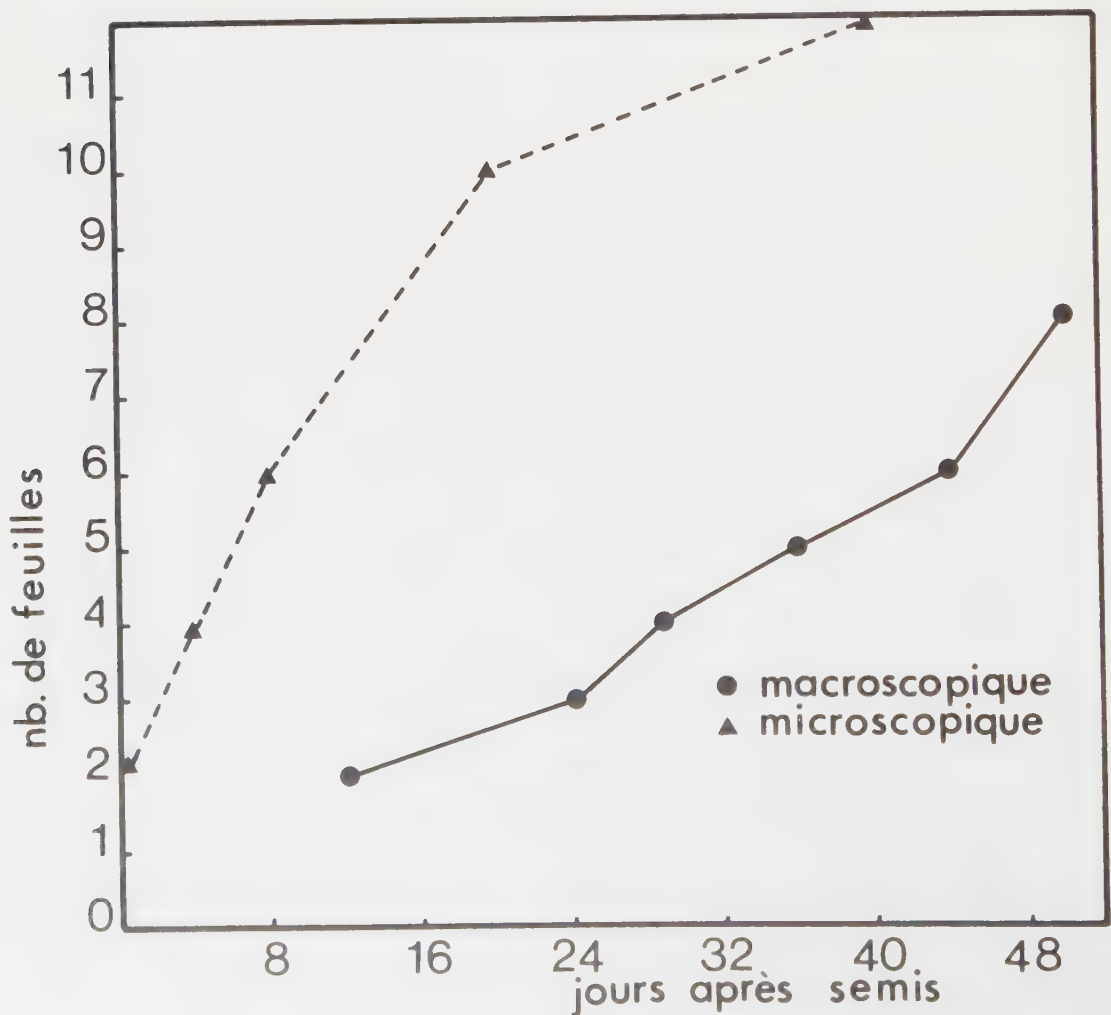


Fig. 11. Evolution de l'activité peroxydasique totale (extraite des feuilles adultes à pH 7) dosée au début du JC en fonction du stade de développement de *Spinacia* (nb de feuilles par plante). Les plantes ont entre 1 et 7 semaines (voir fig. 12). L'activité est exprimée par rapport au poids frais ou au mg de protéine. Quatre expériences donnent des résultats similaires.



végétatif à l'état floral qu'après avoir formé un certain nombre de feuilles (Hillman, 1964). L'évolution des peroxydases au cours de la vie de la plante en jours courts, qui ressemble à celle observée en jours longs (voir chapitre V), correspond éventuellement à l'acquisition de l'aptitude à fleurir. Elle pourrait plus simplement être rattachée au vieillissement des cotylédons ou à la cessation de la croissance de l'hypocotyle. Enfin, les changements dans la variation journalière des activités peroxydasique et auxine-oxydasique semblent traduire une perturbation de la sensibilité photopériodique qui peut être rapprochée de l'influence de l'âge de la feuille sur son aptitude à l'induction florale (Khudairi et Hamner, 1954; Misra et Khan, 1973). On sait en effet que les feuilles âgées perdent souvent leur capacité à promouvoir la floraison en photopériode favorable.

IV. 2. LES ISOPEROXYDASES

Trois techniques: les gels Sephadex, l'électrophorèse sur acrylamide et l'électrofocalisation ont été utilisées pour séparer les peroxydases de feuilles d'Epinard. Les résultats obtenus dans chaque cas sont comparables, bien que différents dans leurs détails. La combinaison d'une résine Sephadex échangeuse de cations et d'un gel séparant les molécules selon leur poids moléculaire donne une séparation extrêmement fine. Malheureusement, elle présente le désavantage de ne pas donner de renseignement précis sur la nature physico-chimique des fractions obtenues. Nous reviendrons plus loin sur cet inconvénient. L'électrophorèse sur acrylamide, technique souvent employée pour les peroxydases, a l'avantage d'être relativement rapide, mais elle ne fait apparaître que peu de différences entre

Fig. 12. Apparition des feuilles au cours du temps chez *Spinacia* cultivé en JC. Feuilles visibles (macroscopiques) et feuilles qui viennent d'être formées par l'apex (microscopiques).

les divers types de plantes (résultats présentés au § V.2.2). En revanche, l'électrofocalisation, qui renseigne immédiatement sur le point isoélectrique de chaque pic d'activité, est un peu lente. Elle ne permet, lorsqu'elle est pratiquée en colonne, qu'une expérience à la fois et qui dure 72 heures.

IV. 2. 1. Séparation des peroxydases sur gel Sephadex

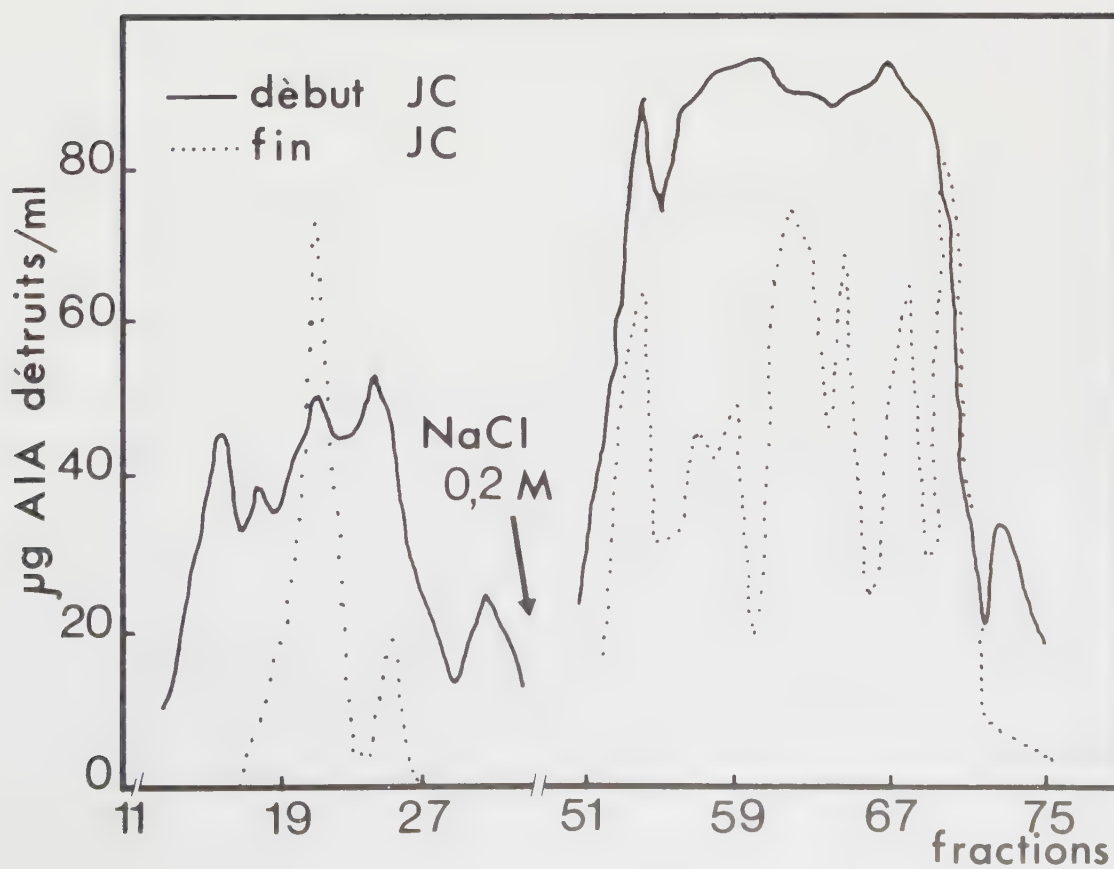
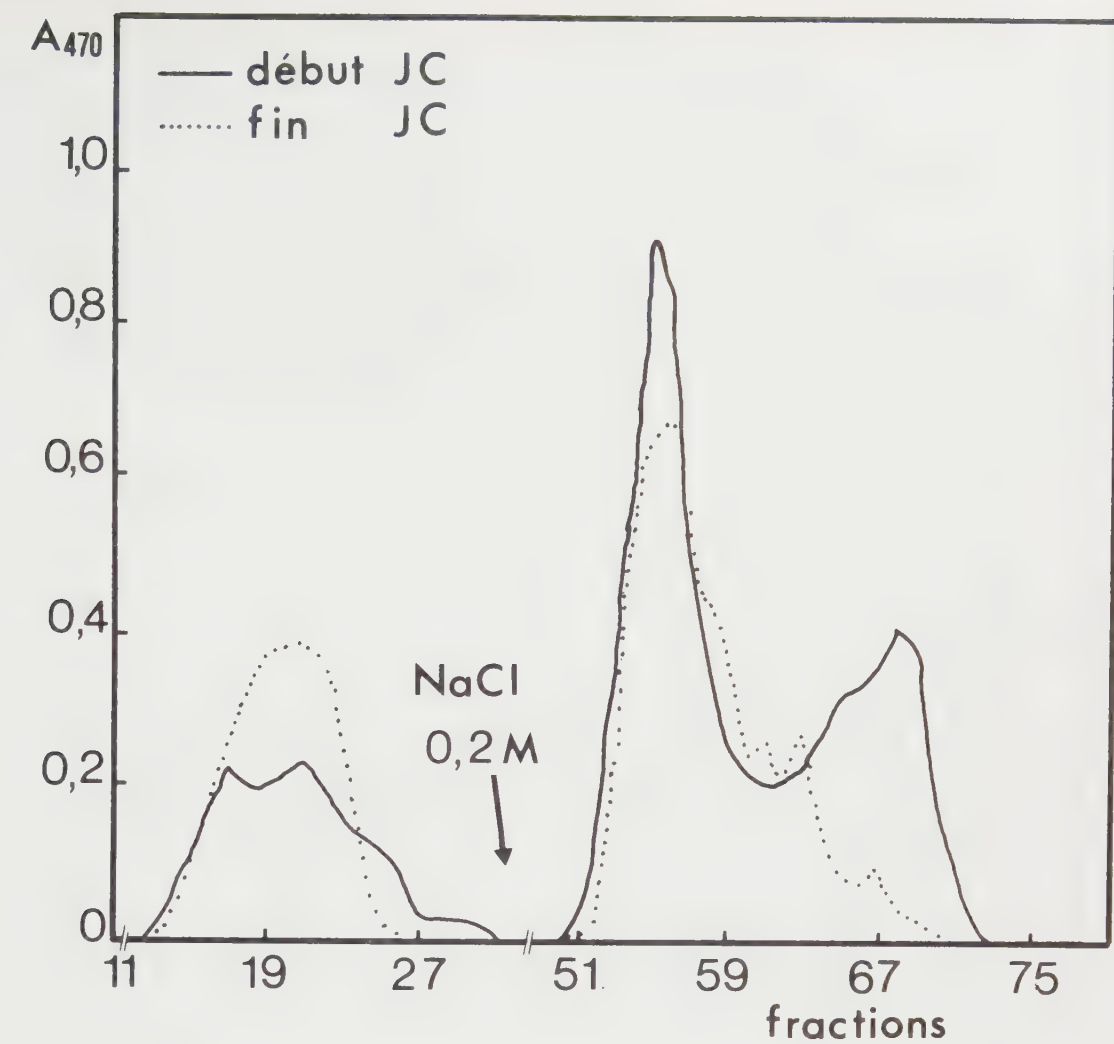
La superposition d'un échangeur d'ions (SE-Sephadex C50) sur un gel de dextrane (Sephadex G100), dans une même colonne, permet une séparation des protéines basée à la fois sur deux critères: la charge électrique et la taille des molécules. Dans les conditions de travail utilisées ici, il y a deux groupes de protéines, le premier constitué de molécules anioniques à pH 5,4, le second de molécules cationiques à ce pH. Les fractions sont séparées à l'intérieur de ces 2 groupes soit en fonction de leur charge relative (plus ou moins retenues dans l'échangeur d'ions), soit en raison de leur masse moléculaire (plus ou moins retenues dans l'échangeur d'ions et dans le gel dextrane). De ce fait, il est impossible de dire, lorsqu'un pic en précède un autre, si c'est parce qu'il est constitué de molécules moins cationiques ou plus grandes. D'autre part, les protéines peuvent être légèrement adsorbées sur le G100, de même que les effecteurs phénoliques qui pourront fausser l'activité de quelques fractions.

Résultats

Les Epinards cultivés en jours courts présentent une forte activité tant peroxydasique qu'AIA-oxydasique. La partie cationique de ces acti-

Fig. 13 (haut). Répartition de l'activité peroxydasique (extraite à pH 7) de feuilles de *Spinacia* au début et à la fin du 55^e JC, après séparation dans une colonne de SE Sephadex C50/Sephadex G100. L'activité est dosée dans chaque fraction.

Fig. 13 (bas). Répartition de l'activité AIA-oxydasique correspondant à la séparation de la fig. 13.



vités est plus développée que la partie anionique (fig. 13 et 14). On peut déceler 7 fractions peroxydasiques au plus, alors que les auxine-oxydases semblent plus diversifiées (environ 11 fractions). Les différences observées dans l'activité totale des peroxydases entre le début et la fin du jour court correspondent à des modifications d'activité de certaines d'entre elles. La séparation réalisée montre en effet que chaque fraction ne suit pas la même évolution. La partie cationique subit une baisse généralisée, très sensible à partir de la fraction 65 (peroxydases très cationiques ou de petites tailles). Les peroxydases anioniques ont une activité plus élevée à la fin de la photopériode.

Chez les AIA-oxydases, la baisse d'activité entre le début et la fin du jour court s'étend à presque toutes les fractions, à l'exception d'une anionique (fig. 14, fraction 21). Certaines d'entre elles semblent même disparaître complètement.

Discussion

Les grandes différences d'activité que présentent les AIA-oxydases entre le début et la fin du jour court sont peut-être partiellement le fait de certains inhibiteurs que la purification partielle entreprise avant la séparation n'aurait pas complètement éliminés. On sait en effet que les polyphénols, dont certains sont des effecteurs auxine-oxydasiques, peuvent se fixer solidement aux protéines.

La séparation sur gels Sephadex montre que l'effet de la photopériode sur chaque peroxydase est différent. Elle favorise certaines d'entre elles et en inhibe d'autres. Il en est de même pour les AIA-oxydases qui, dans presque chaque cas, sont associées à la présence de peroxydases, comme l'avaient montré Gaspar et al. (1969b) chez le Pois. Toutefois, l'activité peroxydasique et auxine-oxydasique associées dans une même fraction peuvent évoluer différemment pendant la photopériode. Cette constatation

et les quelques cas dans lesquels les AIA-oxydases ne sont pas associées à une activité peroxydasique pourraient suggérer qu'il existe d'autres enzymes capables de cataboliser l'auxine (Pilet et Gaspar, 1968; Pilet et Sevhonkian, 1969; van der Mast, 1970b). Il ne fait cependant pas de doute que les peroxydases jouent un rôle essentiel dans la destruction de l'AIA (Meudt, 1964; Hoyle, 1972).

IV. 2. 2. Séparation des peroxydases par électrofocalisation.

Cette technique permet de séparer les protéines dans un gradient de pH. Parvenue à la zone de pH correspondant à son point isoélectrique, une protéine cesse de migrer. Sa position dans le gradient lors de l'élu-tion de la colonne indique son point isoélectrique. Dans le cas présent, les 15 mg de protéines introduits sont insuffisamment purifiés et il faut ajouter dans la colonne de l'urée en concentration 6 molaire, pour éviter leur précipitation. Cette urée peut évidemment dissocier les sous-unités dans le cas où les peroxydases seraient des polymères ou éventuel-lement altérer leur partie protéique.

Résultats

L'électrofocalisation d'un extrait de feuilles d'Epinards cultivés en jours courts pendant un mois révèle, à la fin de la nuit, la présence de 7 à 9 peroxydases, signalées par des flèches sur la figure 15. Deux d'entre elles (4,7 et 9,5) ne sont décelables que dans 50 % des cas. Les autres sont presque toujours présentes, mais leur importance respective varie d'une plante à l'autre. Il arrive que l'une d'entre elles puisse être masquée par une autre dont l'activité est importante. Un ou deux pics peuvent être présents dans certains cas, mais n'apparaissent pas de façon reproductible.

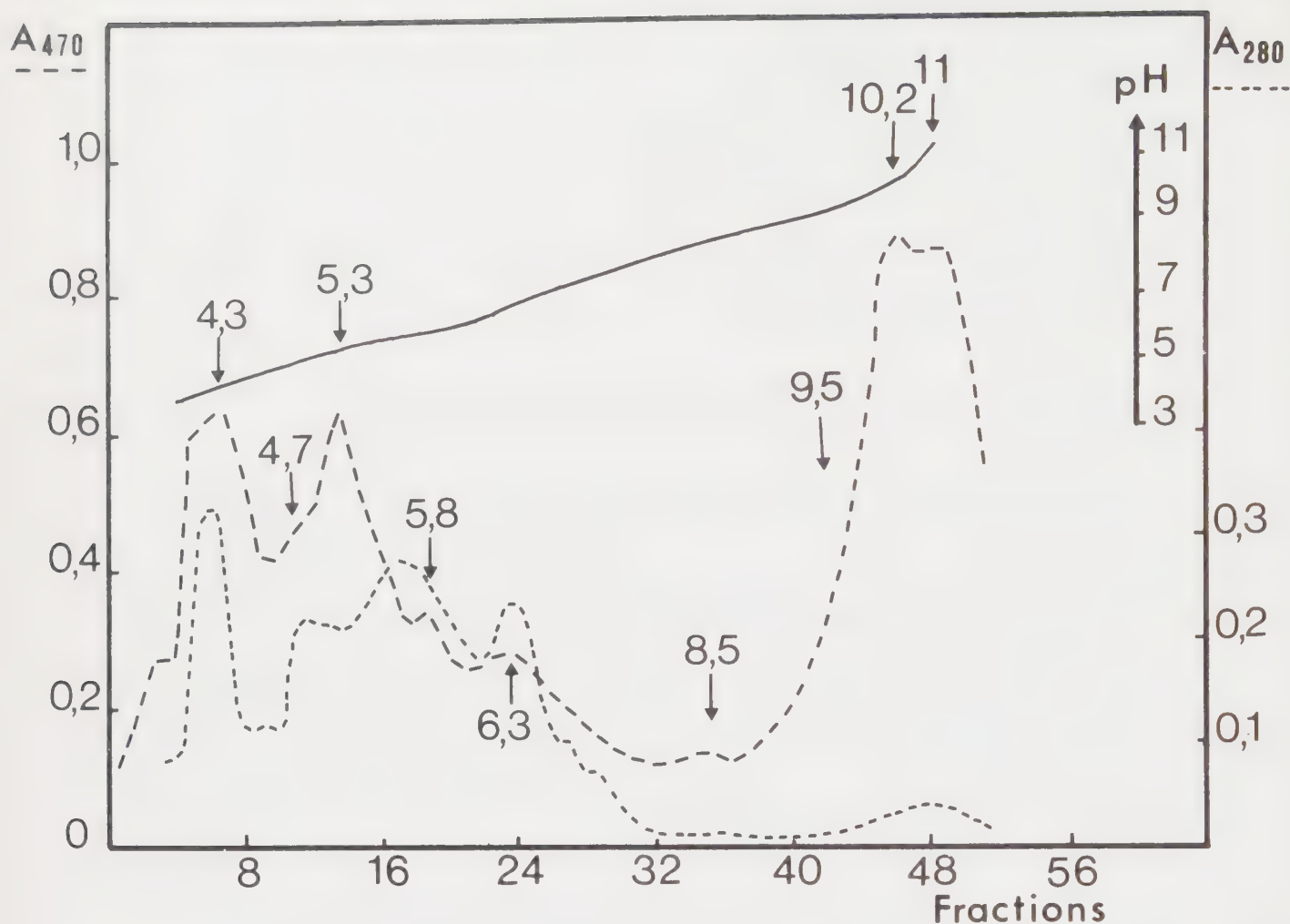


Fig. 15. Répartition de l'activité peroxydasique (extraite à pH 7) de feuilles de Spinacia au début du 30^e JC, après élution de la colonne d'électrofocalisation. L'absorption à 280 nm et le pH sont mesurés à flot continu. L'activité est dosée dans chaque fraction ($A_{470}/0,2 \text{ ml}$).

Les pics des peroxydases les plus basiques (pH 10,2 et 11,0) sont toujours très important en jours courts. La hauteur de ces pics est due en partie au fait que ces protéines ont un point isoélectrique supérieur à la zone de résolution de l'Ampholine utilisée. Dans la région où elles migrent, la pente du gradient est plus forte.

Le rapport de la somme des peroxydases acides (p.i.é. inférieur à 7) et de la somme des peroxydases basiques (p.i.é. supérieur à 7) est généralement proche de 1 chez les Epinards cultivés en jours courts.

Les auxine-oxydases n'ont pas été mesurées après électrofocalisation car les conditions de ce travail ne permettent pas de les détecter (activité trop faible).

IV. 3. LES PEROXYDASES BASIQUES

Les peroxydases basiques ou cationiques sont extrêmement actives en jours courts. Elles sont sensibles à la photopériode puisque leur activité baisse au cours des 8 heures de lumière du jour court (fig. 13). Il a semblé intéressant de les séparer des autres peroxydases par une méthode assez simple pour les doser rapidement. Pour cela, chaque extrait est mis en contact avec l'échangeur de cations CM Sephadex C50. Le pH de ce mélange est assez élevé (9,2), si bien que seules les peroxydases très basiques se fixent sur l'échangeur d'ions. On les sépare alors en filtrant la résine puis en les décrochant avec une solution concentrée de NaCl.

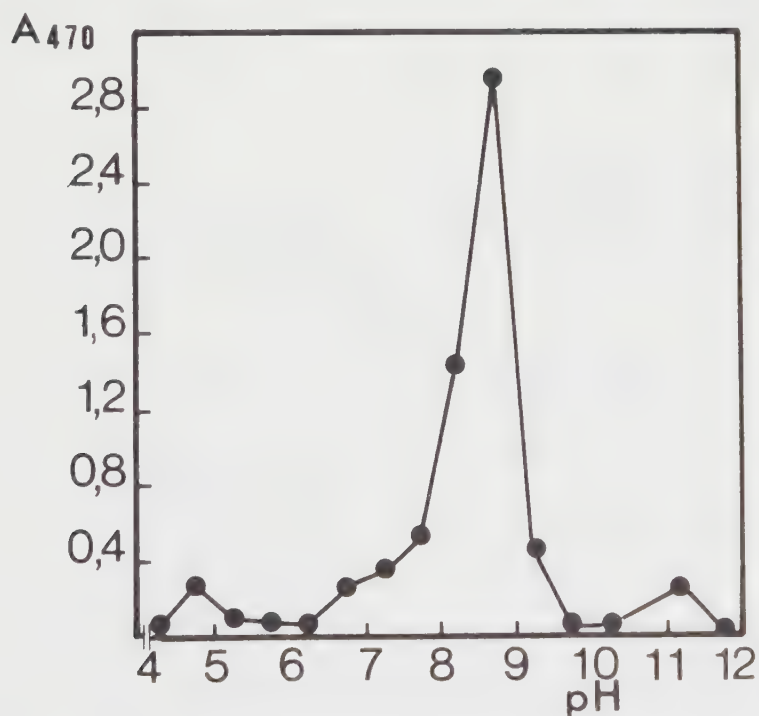


Fig. 16. Répartition de l'activité peroxydasique en fonction du pH après l'électrofocalisation d'une préparation de peroxydases basiques faite à partir de feuilles de *Spinacia* au début du 30^e JC. L'absorption à 470 nm est reportée en fonction des zones de pH (de 0,5 en 0,5).

Résultats

Les peroxydases basiques sont extraites à pH élevé (Na_2CO_3 0,05 M). Cela signifie que leur charge nette sera proche de la neutralité et que de ce fait elles ne resteront pas fixées électrostatiquement aux membranes, aux parois et aux organelles. Lorsque l'extraction est effectuée à pH neutre et à faible force ionique (tampon phosphate 0,066 M), une grande partie des peroxydases basiques sont accrochées électrostatiquement. Plus de la moitié est insoluble (tableau III). La plupart sont fixées aux gros fragments de membranes et peut-être à certaines organelles dans le culot de la centrifugation à 50000g. Une partie est fixée soit à de petits fragments de membranes, soit aux ribosomes dans le culot de 135000g. La méthode d'extraction et de séparation utilisée permet de doser toutes ces fractions à la fois, plus une grande partie des peroxydases qui resteraient dans le culot à 10000g à pH 7.

TABLEAU III. ACTIVITE DES PEROXYDASES BASIQUES (A_{470} /mg prot.) DANS LES CULOTS DE DIFFERENTES CENTRIFUGATIONS APRES EXTRACTION A pH 7.

Centrifugation à 1000g pendant 10 min.	
culot	surageant A_{470} /mg prot: 22,6
centrifugation à 50000g pendant 30 min.	
culot A_{470} /mg prot: 12,7	surageant
centrifugation à 135000g pendant 210 min.	
culot A_{470} /mg prot: 5,8	surageant A_{470} /mg prot: 15,6

Ces peroxydases basiques peuvent être soumises à l'électrofo-calisation. Il faut pour cela éliminer le chlorure de sodium par dialyse. Le résultat obtenu est paradoxal (fig. 16). Elles se trouvent en grande partie dans un pic à pH 8,5. Il y a également un petit pic à pH 4,5 et un autre à pH 11,0, qui peut être parfois plus important. Lorsqu'on com-pare ce résultat à celui de la figure 15, on note l'élimination presque totale des peroxydases acides et la disparition des pics à pH 10,2 et 11,0, au profit de l'apparition du pic à pH 8,5, qui n'était pas important dans la séparation de l'extrait entier. Nous reviendrons sur ce fait plus loin.

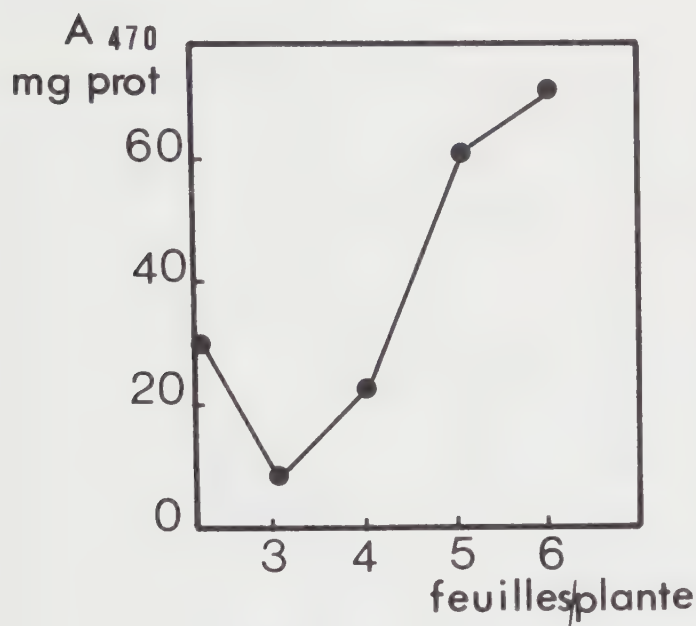


Fig. 17. Evolution de l'activi-té des peroxydases basiques (ex-traites à pH 10,5) dosée au dé-but du JC en fonction du stade de développement de Spinacia (nb de feuilles par plante). Les plantes ont entre 1 et 7 semaines (fig. 12). Trois ex-périences donnent des résultats similaires.

En jours courts, les peroxydases basiques suivent la même évolu-tion que les peroxydases totales. Leur activité baisse de 30 à 50 % pendant la journée, soit plus que l'activité totale dont les variations pourraient bien être la conséquence de celles des peroxydases basiques, compensées en partie par l'évolution inverse des peroxydases acides (tableau I).

De plus, les peroxydases basiques peuvent être soumises à des os-cillations d'une période de quelques dizaines de minutes (40 à 90 minutes) qui compliquent leur étude. On ne peut en effet comparer que l'activité de feuilles identiques de plantes comparables et les extractions ne doivent pas être séparées de plus de quelques minutes.

Les peroxydases basiques évoluent au cours de la vie de la plante (fig. 17). Elles passent par un minimum d'activité qui ne correspond pas obligatoirement avec le minimum de l'activité totale.

IV. 4. RESUME

L'activité peroxydasique et auxine-oxydasique des Epinards cultivés en jours courts présente des variations journalières. Ce sont les peroxydases basiques qui varient le plus. Chaque fraction semble avoir un comportement particulier vis-à-vis de la photopériode. L'activité évolue également au cours de la vie de la plante. Elle passe par un minimum qui coïncide avec un certain stade de développement de la plante (4 feuilles), puis elle augmente dans les feuilles avec l'âge de celles-ci. Son niveau est aussi dépendant de l'âge de la plante.

L'activité AIA-oxydasique n'est que rarement dissociée de l'activité peroxydasique. Mais en général, il n'y a pas de corrélation entre les niveaux de ces deux activités. L'intervention d'effecteurs du catabolisme auxinique n'est pas à exclure dans l'explication de ces disparités.

V. ETUDE DES PEROXYDASES D'EPINARDS CULTIVES EN JOURS LONGS

V. 1. PEROXYDASES TOTALES

Résultats

L'activité des peroxydases d'épinards cultivés en lumière continue présente au cours de la vie des plantes une évolution similaire à celle observée en jours courts. Dans les deux cas, elle atteint un minimum lorsque les plantes ont 4 feuilles bien développées. L'évolution est toutefois

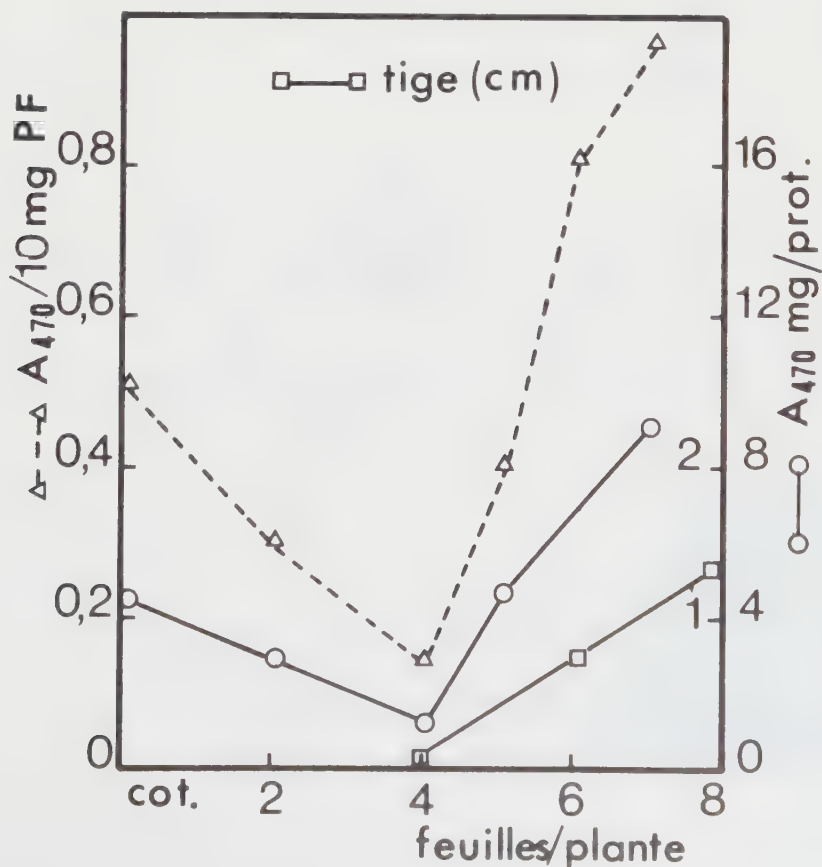


Fig. 18. Evolution de l'activité peroxydasique totale (extraite des feuilles adultes à pH 7) en fonction du stade de développement de Spinacia cultivé en JL. Les plantes ont entre 8 et 24 jours.

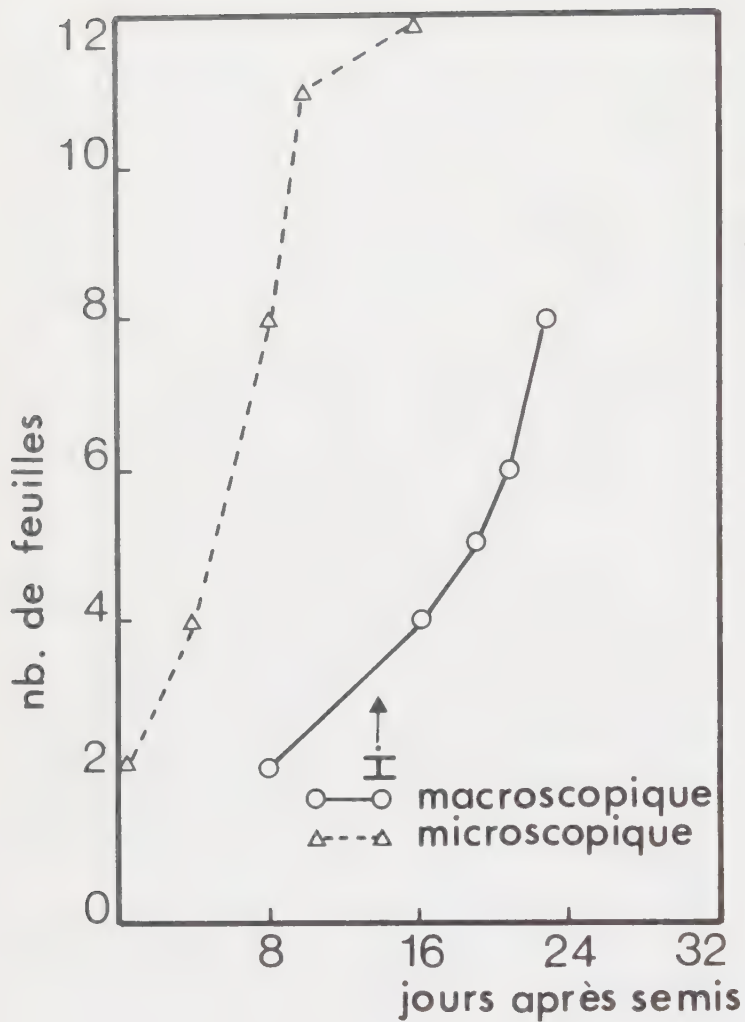
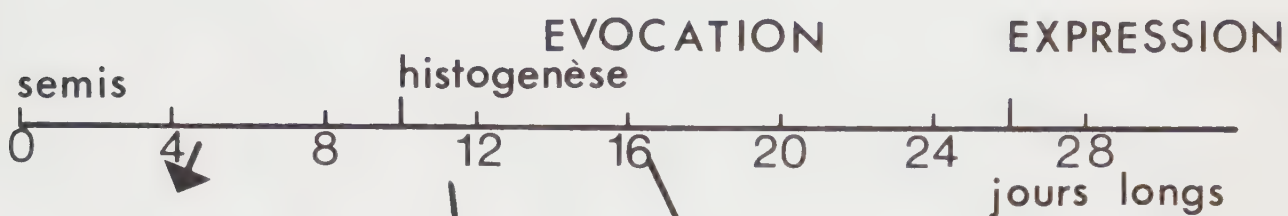
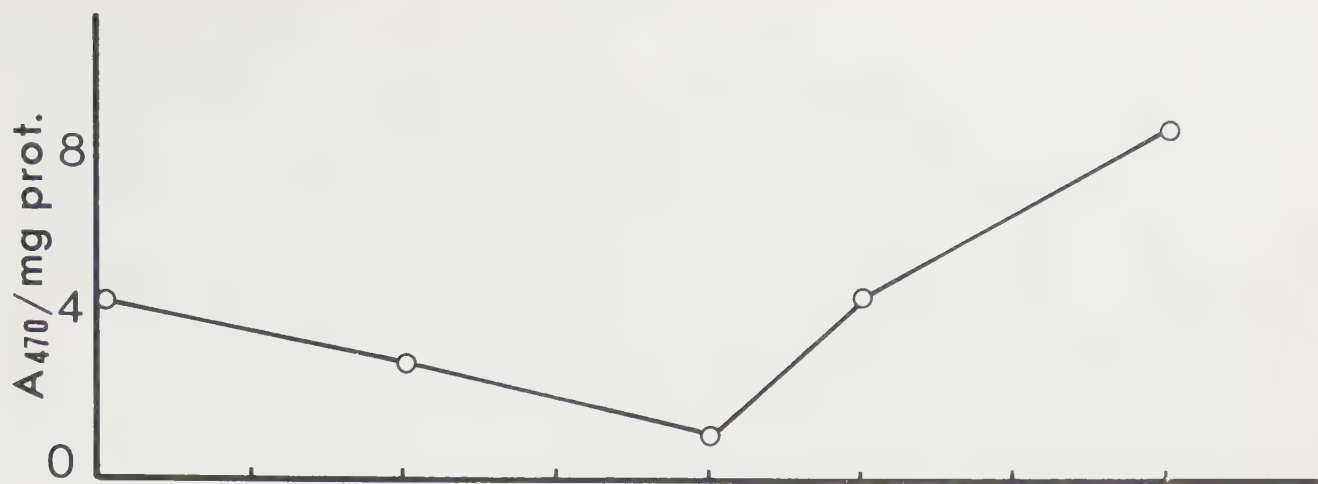


Fig. 19. Apparition des feuilles au cours du temps chez *Spinacia* cultivé en JL. Feuilles visibles (macroscopiques) et feuilles qui viennent d'être formées par l'apex (macroscopiques).

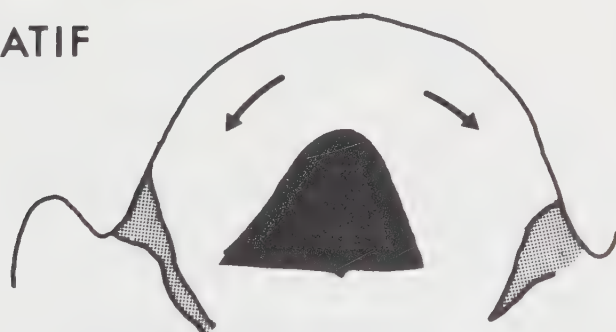
plus nettement accusée en jours longs (fig. 18). En jours courts, la diminution d'activité entre les stades 2 et 4 feuilles est peu perceptible, alors qu'en lumière continue, elle atteint plus de 50 %. D'autre part, la valeur du minimum est sensiblement plus basse dans le second cas (fig. 11 et 18), où il correspond au début de l'allongement de la tige.

Le plastochrone des épinards cultivés en jours longs est beaucoup plus court que celui des plantes en jours courts (fig. 19). Cependant, dans les deux types de plantes, le méristème apical a formé 11 ou 12 feuilles lorsque l'activité peroxydasique est à son niveau le plus bas. La progression de cette activité peut être rapprochée de ce qui se passe dans

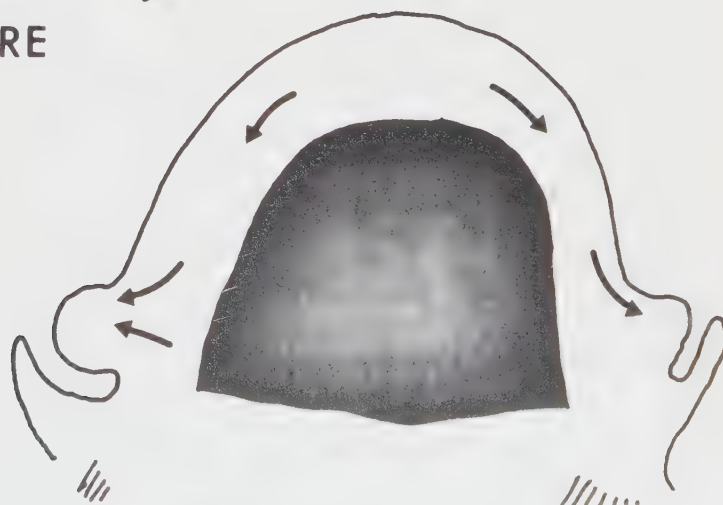
Fig. 20. Evolution de l'activité peroxydasique totale dans les feuilles adultes ($A_{470}/\text{mg prot.}$), comparées aux stades de développement de l'apex chez *Spinacia* cultivé en JL.



VEGETATIF



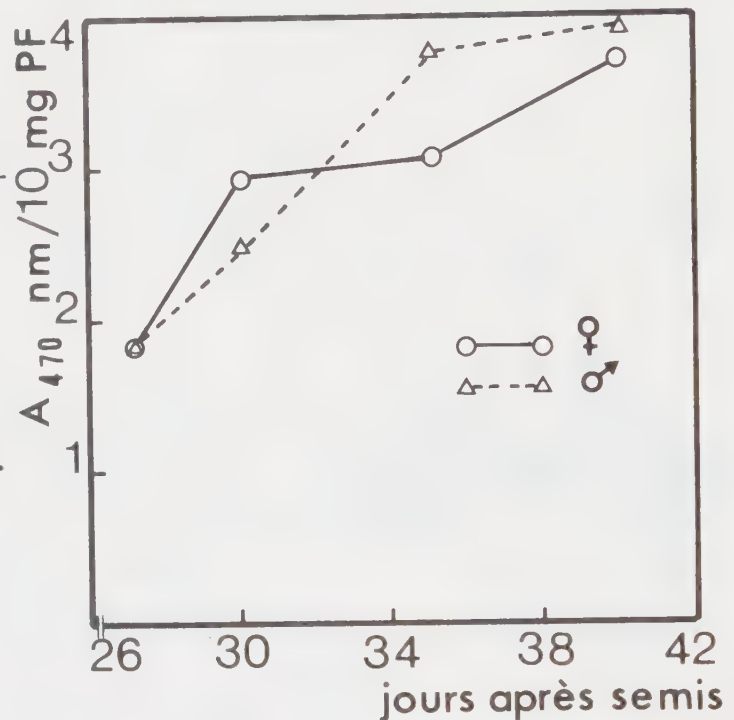
INTERMEDIAIRE



FLORAL

l'apex. On constate que durant la phase de diminution ce dernier est d'abord dans un état purement végétatif, puis que son anneau initial cesse de fonctionner, alors que la zone centrale prend de l'importance (état intermédiaire). Le minimum d'activité des peroxydases dans les feuilles adultes et l'apparition de l'évocation florale caractérisée par l'état floral de l'apex coïncident (fig. 20).

Fig. 21. Evolution de l'activité peroxydasique totale (extraite à pH 7) au cours du temps chez *Spinacia* après floraison (JL). L'activité dosée à 8 heures le matin est exprimée par rapport au poids frais.



Durant l'expression florale, l'activité peroxydasique totale ne cesse de croître. Elle peut atteindre 20 fois la valeur minimum observée au stade 4 feuilles chez les plantes sexuées. On remarque que la différenciation sexuelle a une influence sur elle (fig. 21). L'activité peroxydasique en effet augmente plus régulièrement chez les mâles que chez les femelles, qui présentent un palier peu après l'apparition des pistils.

Discussion

La très forte augmentation de l'activité peroxydasique observée après la floraison est certainement due au vieillissement. Cette constatation a déjà été faite dans de nombreuses publications, mentionnées dans

férences par rapport à des plantes non sexuées cultivées en jours courts. On remarque l'absence des premières fractions cationiques (fig. 22 et 23: fractions 51 à 55) très développées en jours courts. Chez les mâles comme chez les femelles, le maximum d'activité se trouve à la fraction 61, ce qui est très différent de la composition isoperoxydasique en jour court (cf fig. 13 et 14). Les deux zones d'activité, cationique et anionique, sont d'importance égale, alors qu'en jour court, la cationique était prédominante. On peut noter que les mâles ont une activité peroxydasique plus importante que les femelles.

Le profil isoperoxydasique des plantes sexuées ressemble plus à celui des plantes à la fin du jour court qu'au début de celui-ci. Il n'y a pas de différence qualitative nette entre les sexes.

L'activité AIA-oxydasique montre une coïncidence presque parfaite avec les peroxydases. Elle est forte et répartie dans peu de fractions chez les mâles et plus diversifiée chez les femelles qui possèdent un pic en plus (fraction 70). La technique de dosage utilisée, avec pour cofacteur le 2,4-dichlorophénol et le chlorure de manganèse ne permet pas d'être assuré que tous les pics d'activité AIA-oxydasique correspondent réellement à des auxine-oxydases fonctionnelles in vivo. On sait que les peroxydases peuvent oxyder le dichlorophénol et que ce dernier est alors capable, par un mécanisme de radicaux libres, de dégrader l'AIA (Fox et Purves, 1968). Il n'est pas sûr qu'un tel processus se produise dans la cellule.

Fig. 22. (haut). Répartition des activités peroxydasique ($A_{470}/0,1$ ml) et AIA-oxydasique (μ g AIA détruits/ml) extraites à pH 7 de feuilles de *Spinacia* mâle, après séparation dans une colonne de SE Sephadex C50/Sephadex G100. Les activités sont dosées dans chaque fraction.

Fig. 23 (bas). Idem, *Spinacia* femelle.

V. 2. 2. Electrophorèse sur gel d'acrylamide

A pH 4,3, les peroxydases sont en grande majorité chargées positivement. Elles migrent vers la cathode. Ce système de séparation permet de faire apparaître 9 bandes différentes. La seule différence entre les feuilles de plantes mâles et de plantes femelles est la présence chez ces dernières de la bande n° 3, absente chez les mâles (fig. 24). Il s'agit d'une peroxydase relativement peu cationique.

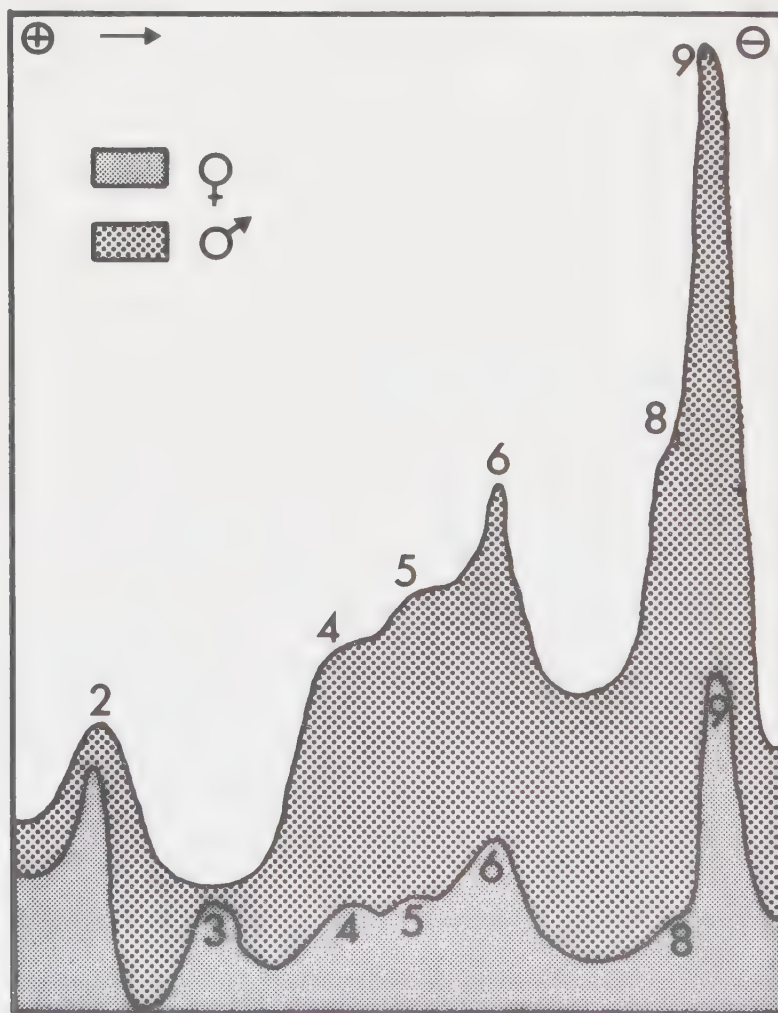


Fig. 24. Séparation des peroxydases cationiques de *Spinacia* mâle et femelle par électrophorèse sur gel d'acrylamide.

Il n'est pas possible de trouver une correspondance avec la séparation sur gel Sephadex. On remarque que l'intensité de toutes les bandes

l'introduction. Chez les plantes sexuées, il n'y a plus de feuilles adultes disponibles pour les dosages, puisque la plante a cessé d'en former. C'est donc sur des feuilles de plus en plus sénescences que s'effectuent les dosages.

La différence observée entre les plantes mâles et femelles correspond vraisemblablement à leur vitesse de vieillissement différente. Les mâles vieillissent plus vite que les femelles qui doivent encore assurer la maturation des graines (Leopold et al., 1959).

Il est tentant de relier l'activité des peroxydases au taux en auxines endogènes libres. Toutefois nous n'avons pas mesuré ce dernier. Nous savons cependant que dans de nombreuses plantes, il passe par un minimum au début de leur développement floral (Cooke, 1954). Nous reviendrons sur ces faits dans la discussion finale, ainsi que sur la similitude d'évolution des peroxydases en jours courts et en jours longs.

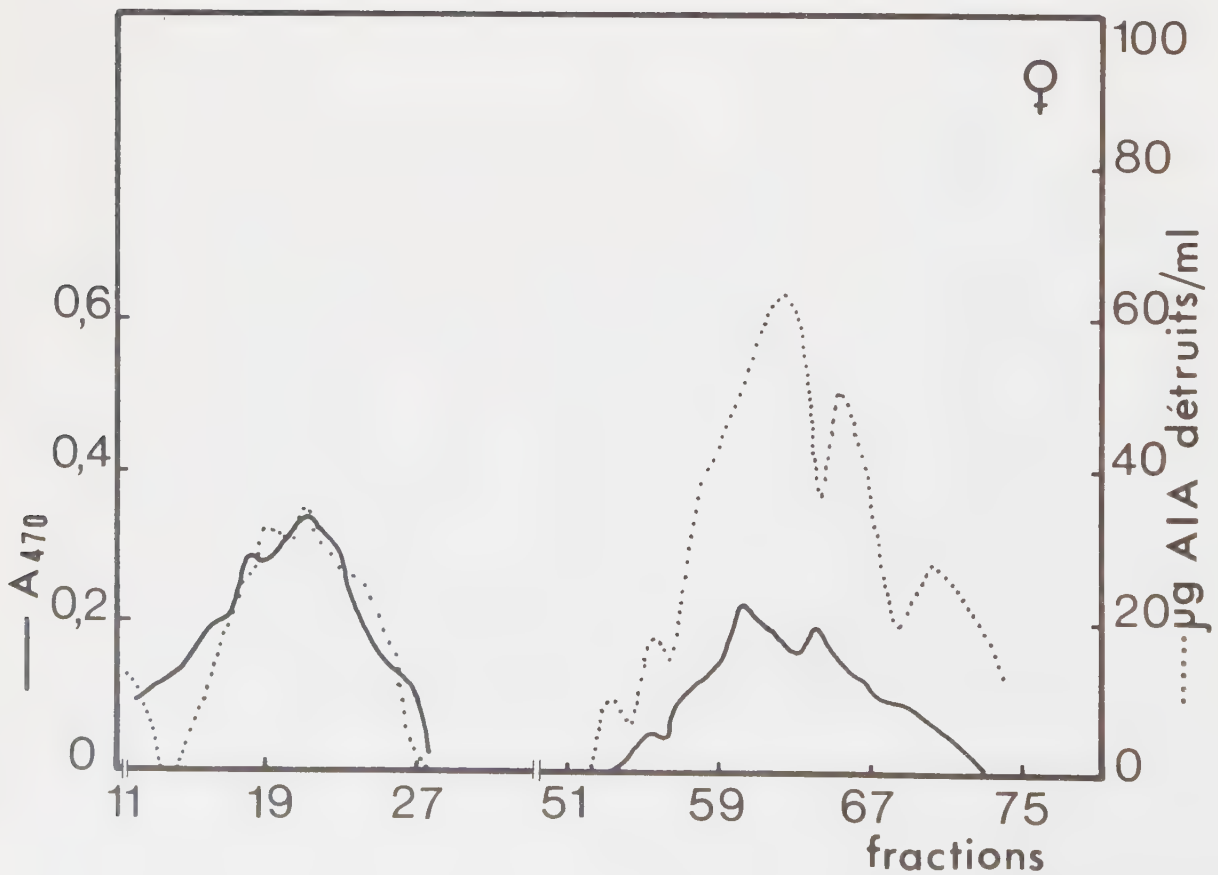
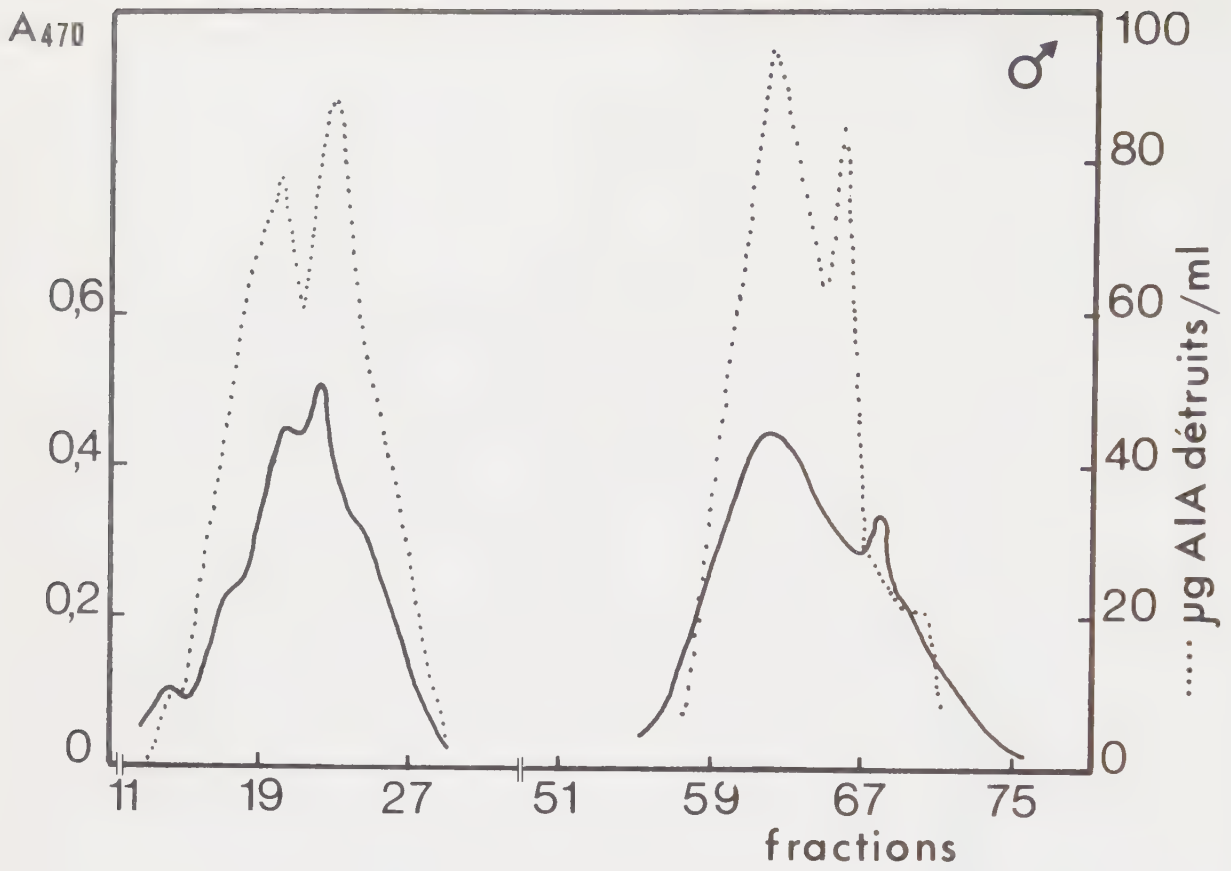
V. 2. LES ISOPEROXYDASES

L'étude de la répartition des diverses fractions peroxydasiques dans les feuilles de plantes cultivées en jours longs est délicate. Le matériel végétal sélectionné est en effet beaucoup moins homogène qu'en jours courts. Il est difficile de savoir à quel moment la différenciation sexuelle se répercute sur les isoperoxydases. De plus, les mâles et les femelles vieillissent de façon différente. Or, le vieillissement peut modifier la nature des isoperoxydases.

V. 2. 1. Séparation sur gel Sephadex

Résultats

Des Epinards mâles et femelles de même âge (35 JL) et de même taille (20 cm) présentent un certain nombre de particularités et de nettes dif-



est plus forte chez les mâles, excepté pour les moins cationiques. Cette technique n'apporte pas de grands enseignements sur la répercussion de la différenciation sexuelle sur les peroxydases.

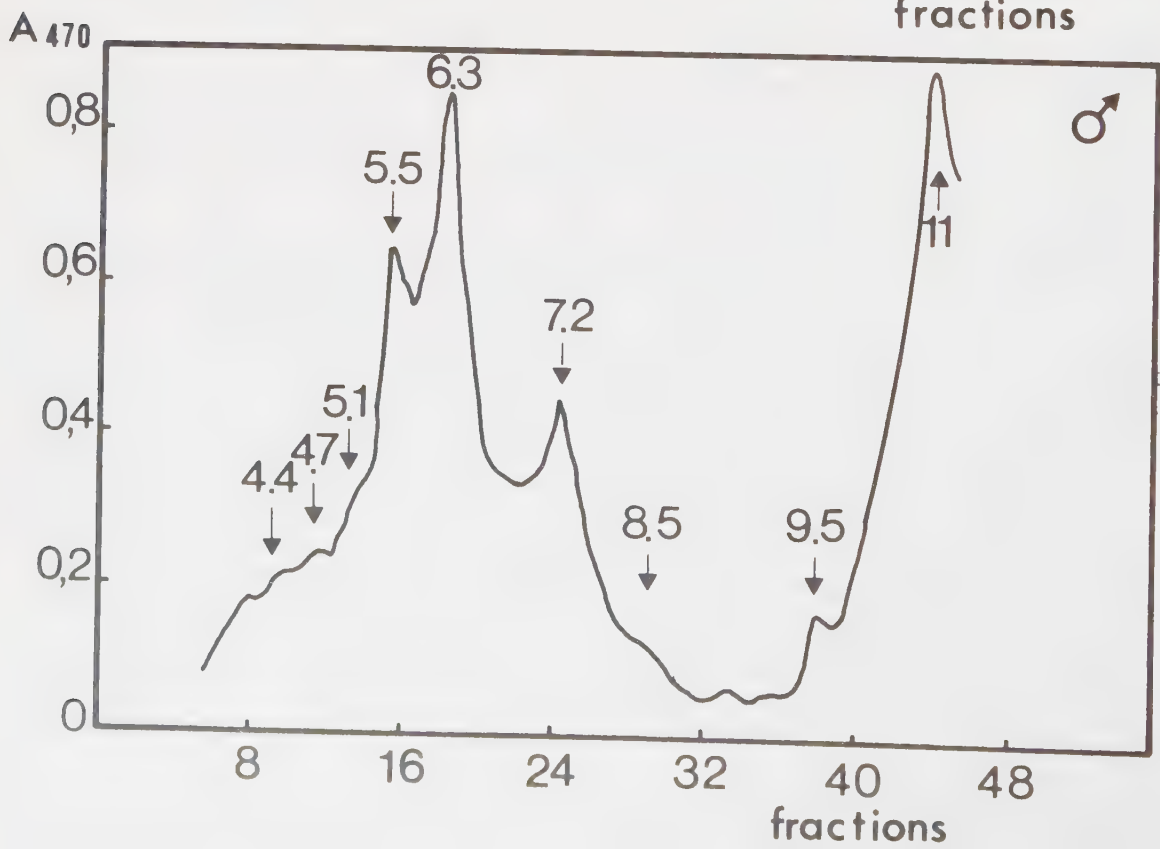
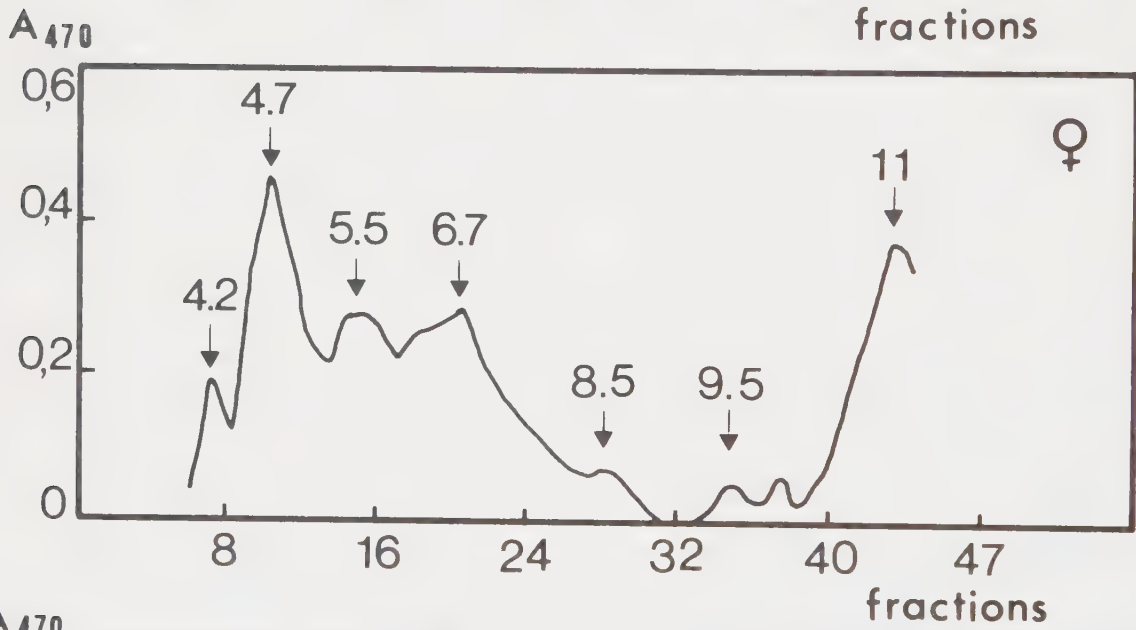
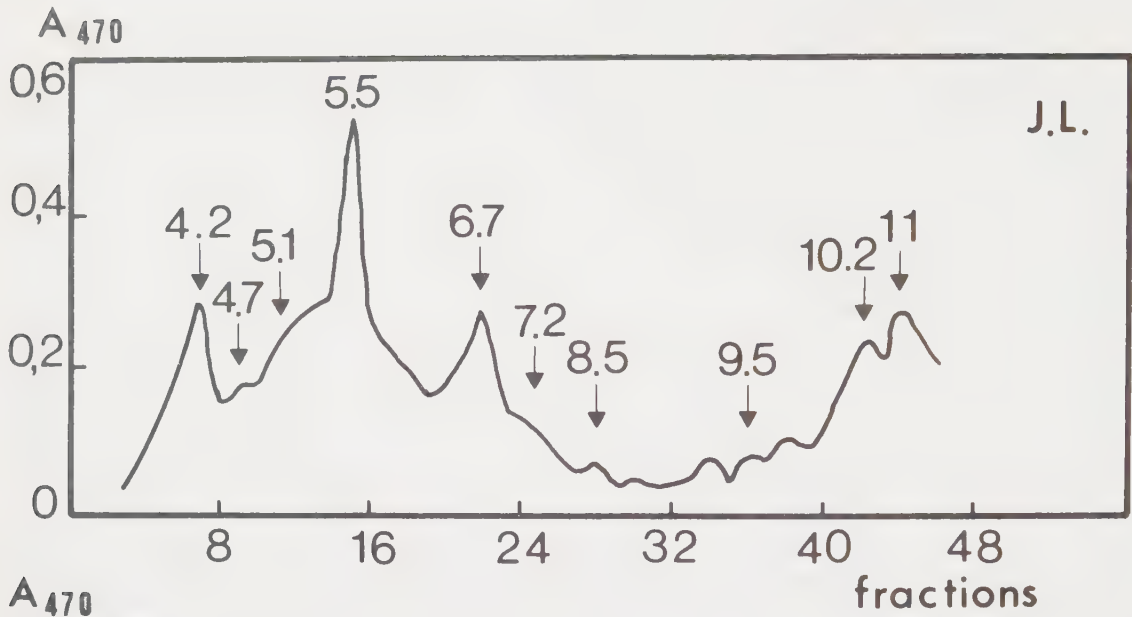
V. 2. 3. Electrofocalisation

Résultats

L'électrofocalisation des peroxydases de plantes de jours longs, sexuées ou non, comparée à celle des plantes de jours courts (fig. 15), montre que la différenciation de l'Épinard ne s'accompagne pas de très grands bouleversements (fig. 25, 26 et 27). Il n'y a en effet que peu d'isoperoxydases dont on puisse dire qu'elles sont spécifiques de tel ou tel état physiologique ou de tel sexe.

Pour établir la répartition isoperoxydasique de chaque état, on peut, à partir de plusieurs électrofocalisations, porter le nombre de fois qu'un pic est présent pour chaque dixième de pH (fig. 28). Nous avons déjà vu que certains pics n'apparaissent que de façon épisodique et que d'autres peuvent être masqués, surtout dans la zone acide. Si le nombre de séparations pour un même état est suffisamment élevé, les isoperoxydases apparaissent clairement, mis à part quelques rares cas litigieux. Cette façon de procéder permet d'établir la liste des peroxydases présentes dans chaque état (tableau IV).

Les plantes cultivées en jours longs sont un peu plus riches en isoperoxydases que les plantes de jours courts; les plantes femelles et les plantes mâles ont chacune une peroxydase spécifique (respectivement 6,7 et 7,2). Cela mis à part, les plantes sexuées présentent les mêmes pics que les plantes induites dont le sexe n'est pas encore reconnaissable. Celles-ci sont les plus riches en fractions différentes (8 à 12). Comme l'extraction se fait à partir des feuilles de plusieurs plantes dont il



est encore impossible de déterminer le sexe, elles ont souvent à la fois la peroxydase des mâles et celle des femelles.

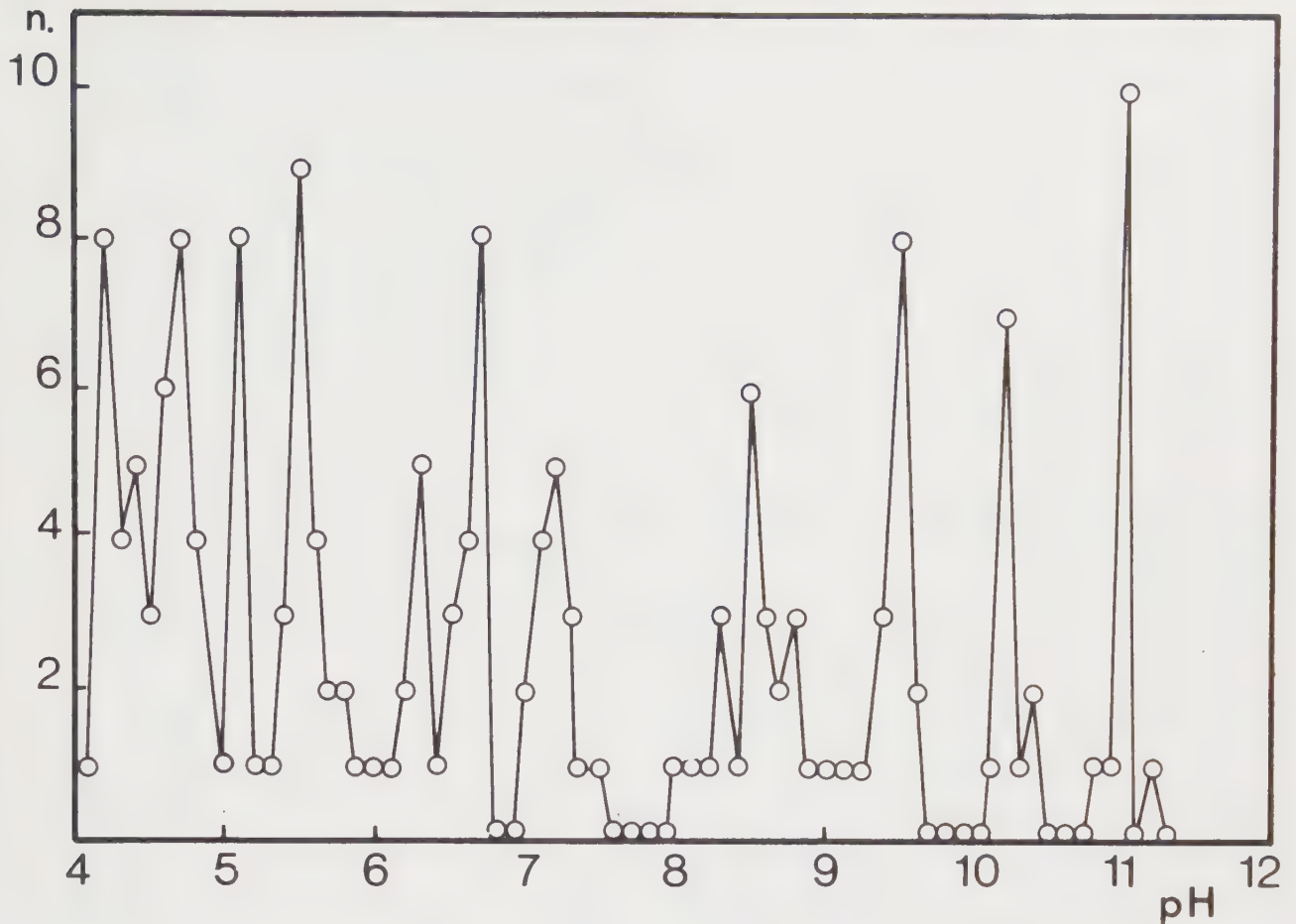


Fig. 28. Récapitulation des pics obtenus lors de 12 électrofocalisations de peroxydases de *Spinacia* cultivé en JL. Le nombre de fois (n) qu'un pic apparaît pour chaque dixième de pH est porté en ordonnée.

Deux peroxydases (4,4 et 6,3) constamment présentes dans les feuilles d'épinards cultivées en jours courts n'apparaissent qu'épisodiquement en jours longs. C'est l'inverse pour les peroxydases à p.i.é. de 4,7 et de

Fig. 25 (haut). Répartition de l'activité peroxydasique (extraite à pH 7) de feuilles de *Spinacia* de 24 JL encore non sexué, après élution de la colonne d'électrofocalisation. L'activité est dosée dans chaque fraction.

Fig. 26 (milieu). Idem, plantes femelles de 35 JL.

Fig. 27 (bas). Idem, plantes mâles de 35 JL.

9,5. Alors qu'en jours courts on retrouve de façon très reproductible les peroxydases à p.i.é. 5,3 et 5,8, en jours longs, elles sont remplacées par 5,1 et 5,5. Il s'agit là, même si la différence de pH entre ces pics n'est pas importante, d'un groupe d'enzymes extrêmement sensibles à la photopériode (voir chapitre VI). Les différences qualitatives concernent donc la région acide et voisine de la neutralité (apparition de 6,7 et de 7,2). La zone alcaline, elle, subit des modifications quantitatives. Les plantes cultivées en jours longs ont une activité plus réduite dans cette région, excepté lors de leur vieillissement.

TABLEAU IV. POINTS ISOELECTRIQUES DES ISOPEROXYDASES REVELES PAR ELECTRO-FOCALISATION.

JC	JL	♀	♂
-	4,2	4,2	(4,2)
4,4	(4,4)	-	(4,4)
(4,7)	4,7	4,7	4,7
-	5,1	(5,1)	5,1
5,3	-	-	-
-	5,5	5,5	5,5
5,8	-	-	-
6,3	(6,3)	-	6,3
-	(6,7)	6,7	-
-	(7,2)	-	7,2
8,5	8,5	8,5	8,5
(9,5)	9,5	9,5	9,5
10,2	10,2	(10,2)	(10,2)
11,0	11,0	11,0	11,0

() non reproductibles

V. 3. LES PEROXYDASES BASIQUES

Résultats

L'activité des peroxydases basiques suit la même évolution générale que celle des peroxydases totales chez les plantes cultivées en lumière continue (fig. 29). Elle passe par une phase de diminution puis par une phase d'augmentation. Comparée à l'activité mesurée en jours courts (fig. 17), la baisse enregistrée en jours longs est un peu plus rapide. Il faut environ 17 jours longs et près de 4 semaines en jours courts après le semis pour atteindre le minimum d'activité.

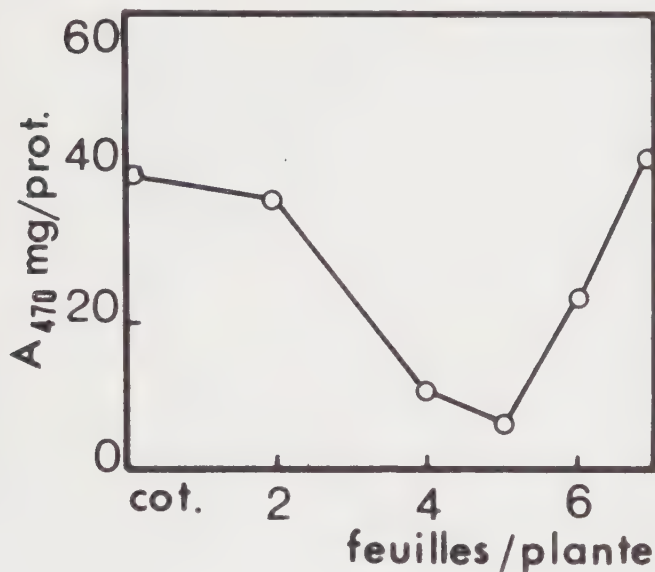


Fig. 29. Evolution de l'activité des peroxydases basiques (extraites à pH 10,5) dosée toujours à 8 h le matin en fonction du stade de développement de *Spinacia* cultivé en JL. Les plantes ont entre 8 et 24 jours.

Excepté pour les plantes très jeunes ou âgées, cette activité est plus faible en lumière continue, où il n'y a pas de variations journalières. Sa valeur n'est pas aussi homogène que dans un lot de plantes de jours courts, en raison de la différenciation sexuelle qui s'instaure avant qu'il n'y ait de critères morphologiques pour distinguer les futurs mâles et les futures femelles.

Chez les plantes cultivées en jours courts, on peut supposer que de nombreux gènes ne s'expriment pas: ils sont bloqués par un milieu dé-

favorable. Cela explique la plus grande variabilité de l'activité des peroxydases basiques en lumière continue et aussi le fait que l'électrofocallisation d'extraits de telles plantes fait apparaître un plus grand nombre d'isoperoxydases qui ne sont pas toujours décelables dans chaque expérience.

Après l'apparition des fleurs, l'activité des peroxydases basiques croît rapidement chez les mâles, alors que, chez les femelles, elle passe par une étape de stabilité de quelques jours, avant de reprendre sa progression (fig. 30). Les peroxydases basiques se comportent de ce point de vue aussi comme les peroxydases totales.

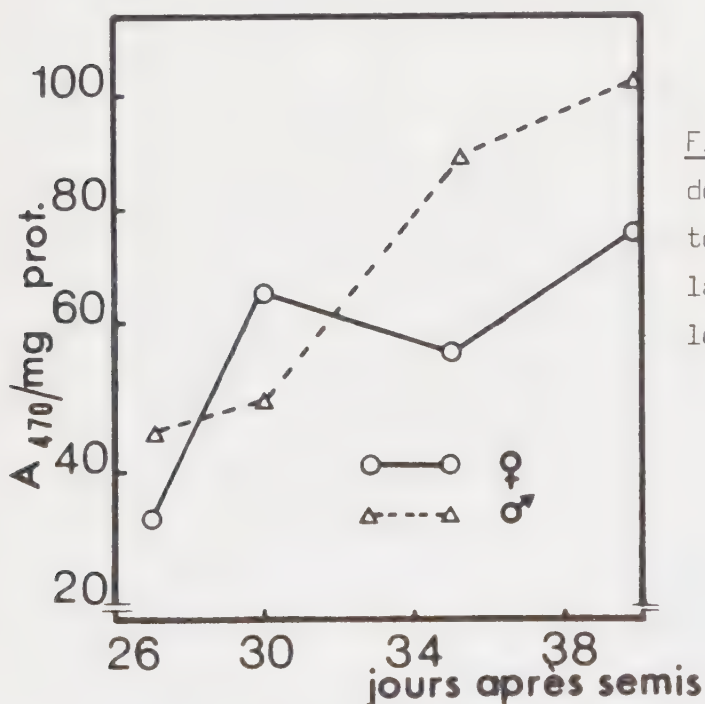


Fig. 30. Evolution de l'activité des peroxydases basiques (extraites à pH 10,5) dosée toujours à la même heure chez *Spinacia* mâle et femelle.

V. 4. RESUME

L'activité des peroxydases de feuilles d'Epinards cultivés en lumière continue ne présente pas de variation circadienne. Elle évolue au cours de la vie de la plante (diminution puis augmentation), présentant un minimum qui intervient simultanément à l'évocation florale de l'apex. Après différenciation sexuelle, les plantes mâles possèdent une activité qui augmente régulièrement; l'activité des plantes femelles se stabilise pendant quelques jours. Les peroxydases basiques évoluent de façon semblable aux pero-

xydases totales. La séparation des isoperoxydases révèle un très petit nombre de différences qualitatives entre les plantes en jours courts et en jours longs d'une part, entre les plantes sexuées mâles et femelles d'autre part.

VI. EVOLUTION DES PEROXYDASES LORS DU TRANSFERT DE JOURS COURTS EN LUMIERE CONTINUE

Lorsqu'une plante de jours longs comme l'Epinard est transférée en lumière continue après avoir été cultivée en jour court dès le semis (induction photopériodique), le fonctionnement de son méristème apical se trouve modifié. Les premières modifications sont perceptibles après 24 heures de lumière. Elles concernent le nombre et l'état physiologique des plastes (Auderset et Greppin, 1972). Il est évident que les processus physiologiques qui participent au mécanisme de l'induction florale dans la feuille doivent être décelés avant que la plante ait reçu 24 heures de lumière, puisque ce sont eux qui sont à l'origine des transformations de l'apex. Le transfert de plantes de conditions non inductrices en conditions inductrices et l'étude des modifications qu'il provoque au niveau enzymatique sont un moyen de recherche des liens éventuels entre une enzyme et l'induction.

VI. 1. PEROXYDASES TOTALES

Résultats

L'activité des peroxydases d'Epinards placés en photopériode courte subit des variations modulées par l'alternance jour-nuit. Lorsque les plantes sont transférées en lumière continue, ces variations, qui n'ont plus le support de la photopériode, disparaissent (fig. 31), ce qui permet de supposer que l'activité peroxydasique est asservie à la photopériode (exorhythme).

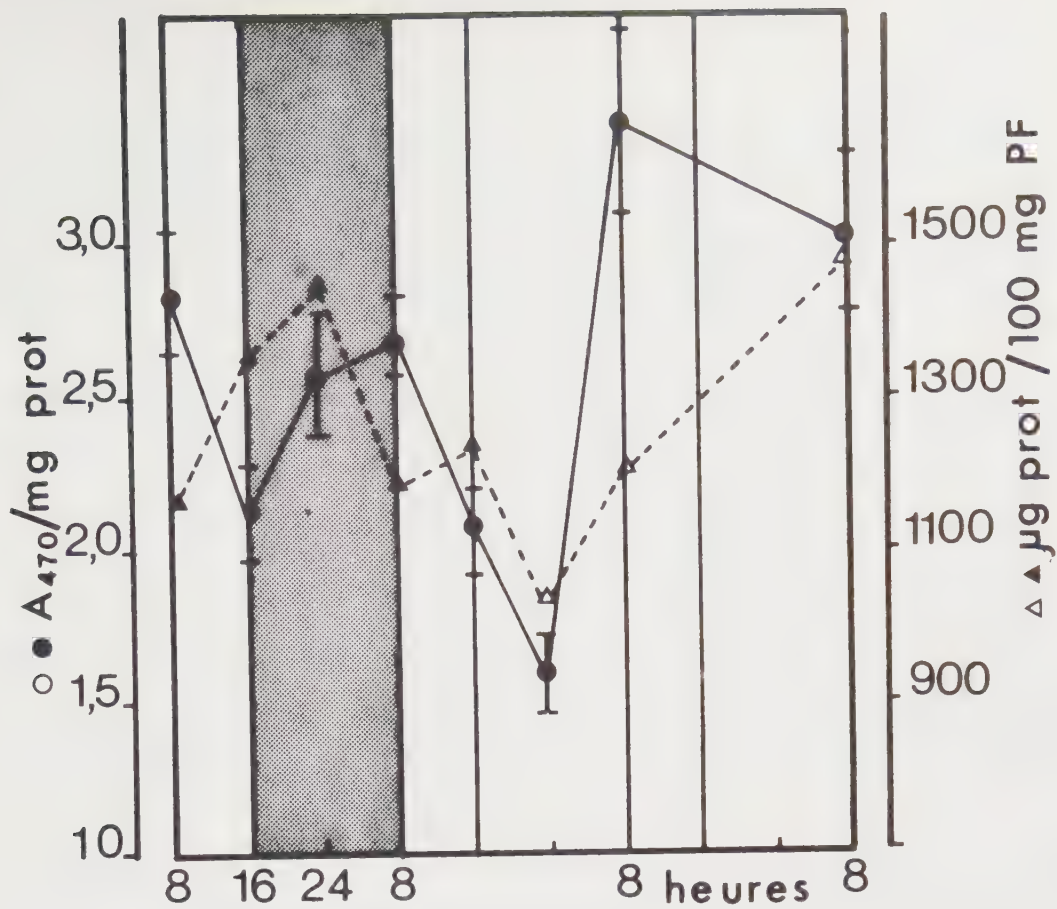


Fig. 31. Evolution de l'activité peroxydasique totale (A_{470} /mg prot.) et des protéines ($\mu\text{g prot.}/100 \text{ mg PF}$) durant le cycle jour court-nuit longue et après transfert en lumière continue de *Spinacia* de 35 JC. Chaque point est la moyenne de 6 mesures.

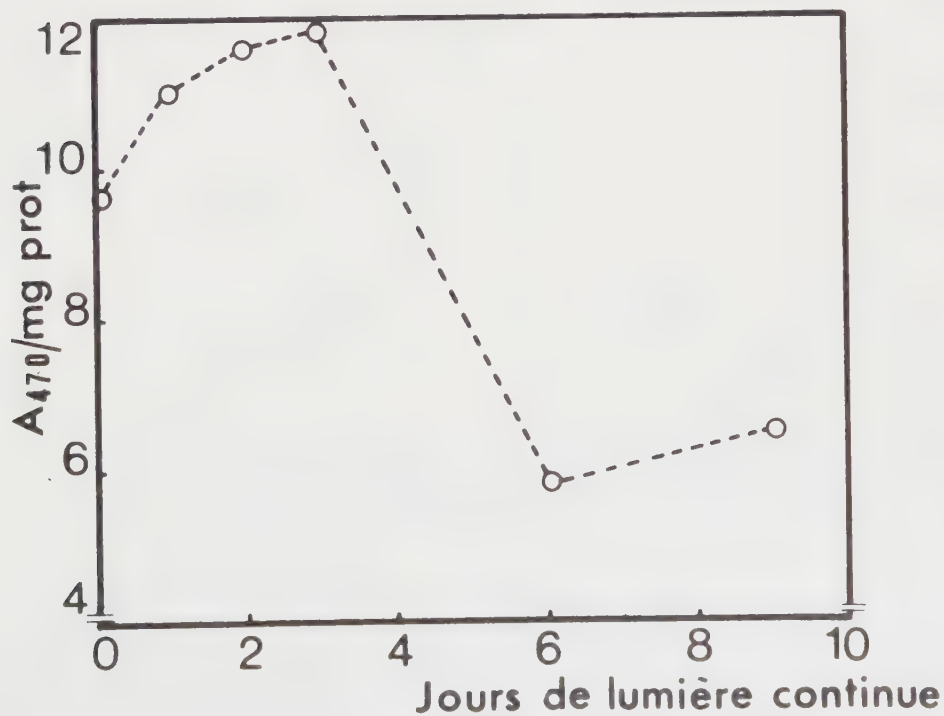


Fig. 32. Evolution de l'activité peroxydasique totale après transfert en lumière continue de *Spinacia* de 55 JC. Chaque point est la moyenne de 3 ou 4 mesures.

On peut observer que, lors de l'induction photopériodique, elle passe par un minimum après 16 heures de lumière (ce qui correspond au milieu de la nuit en jours courts), puis augmente rapidement. Elle est plus forte après 24 ou 48 heures de lumière qu'elle ne l'était en jours courts à la même heure. Le taux en protéines passe lui-aussi par un minimum après 16 heures de lumière. Chez des plantes de jours courts plus âgées, l'activité est plus élevée et la phase d'augmentation après le transfert peut être plus longue (fig. 32). Ensuite, l'activité baisse rapidement et suit alors dans les 2 cas la même évolution que chez des plantes cultivées en lumière continue dès le semis.

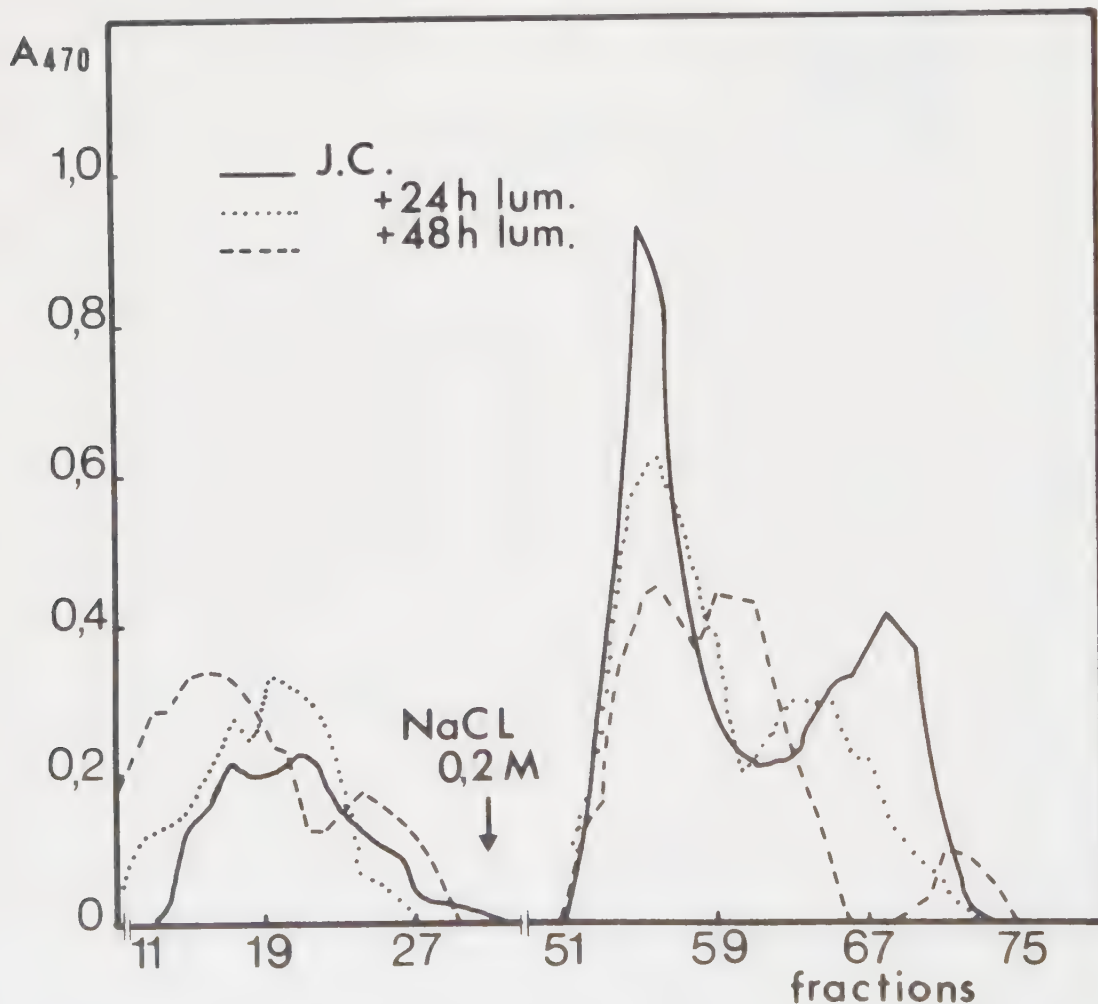


Fig. 33. Séparation des peroxydases sur SE Sephadex C50/Sephadex G100 au début du 55^e JC et après 24 et 48 heures de lumière continue. Les extractions sont effectuées chaque fois à 8 h. le matin. L'activité est dosée dans chaque fraction.

VI. 2. LES ISOPEORXYDASES

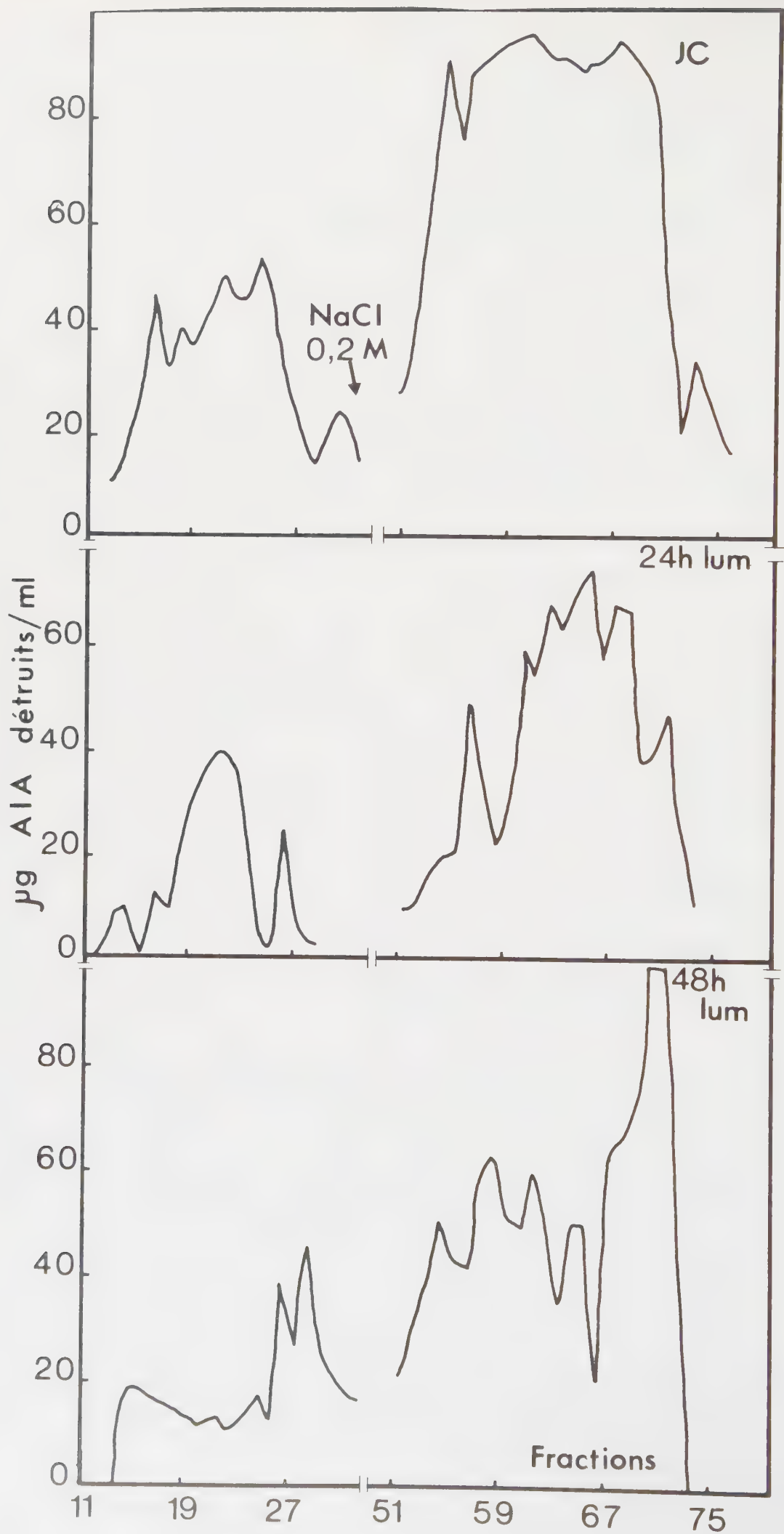
VI. 2. 1. Séparation des peroxydases sur gel Sephadex

Résultats

Lors du transfert en lumière continue, les isoperoxydases séparées au moyen de la combinaison SE Sephadex C50/Sephadex G100 poursuivent l'évolution déjà nettement perceptible durant les 8 heures de lumière du jour court (fig. 13). La lumière provoque une diminution générale de l'activité des peroxydases cationiques à pH 5,4 (fig. 33: fractions 51 à 75). Le grand pic de la fraction 55, qui correspond soit à une molécule de grande taille, soit à une molécule relativement peu cationique, poursuit sa diminution après 24 et 48 heures de lumière. Il en est de même pour le pic de la fraction 68. Les fractions 65 à 75 disparaissent presque complètement en 48 heures de lumière. Ce sont des peroxydases de petites tailles ou très cationiques. Le désavantage de la méthode apparaît ici clairement, puisqu'elle ne permet pas de savoir quelles sont les caractéristiques physico-chimiques exactes des peroxydases sensibles à l'induction. Elle a en revanche l'avantage de faire apparaître nettement l'évolution de ces enzymes.

Il faut noter également dans le groupe des peroxydases cationiques qu'à mesure que disparaissent les dernières fractions l'activité augmente au niveau des fractions 58-60, ce qui pourrait correspondre à l'augmentation du poids moléculaire de certaines peroxydases.

L'accroissement d'activité des peroxydases anioniques à pH 5,4 décelable au cours du jour de 8 heures ne se poursuit pas durant l'induction photopériodique. En revanche, il apparaît à la fraction 12 une nouvelle peroxydase dont l'activité augmente au cours de l'induction.



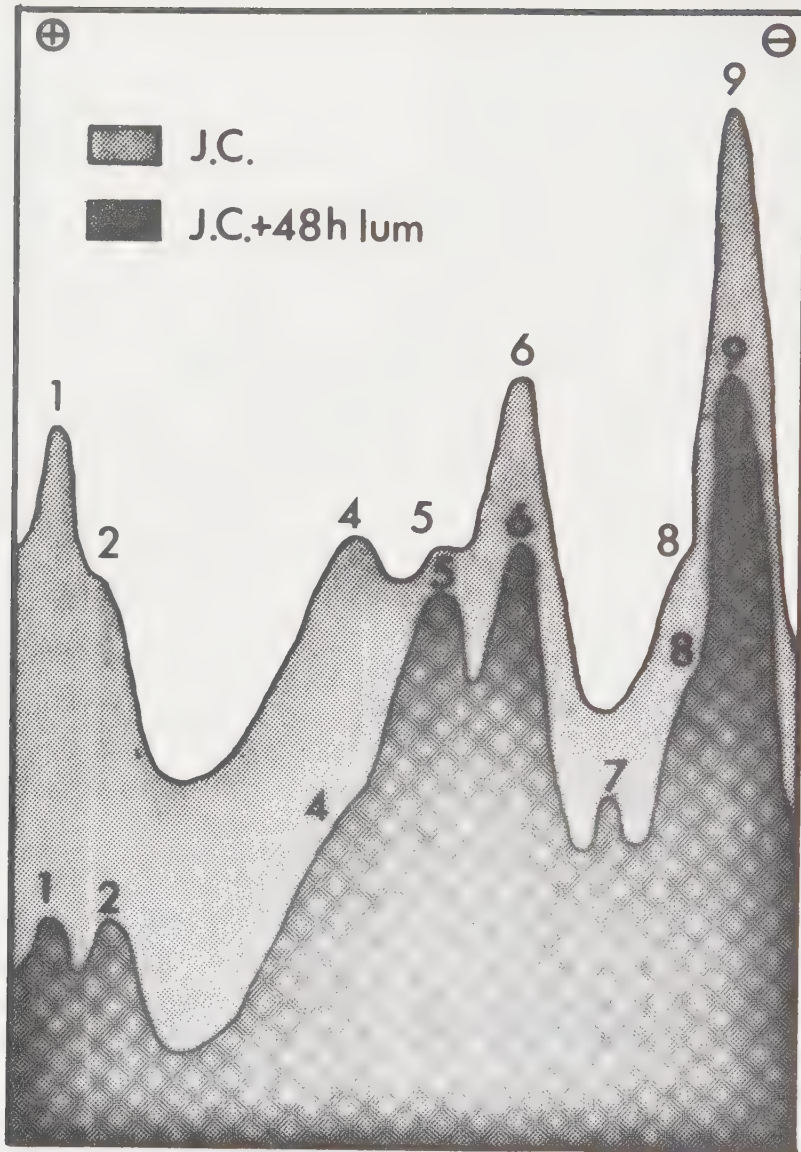
L'activité AIA-oxydasique, mesurée parallèlement à l'activité peroxydasique, est aussi modifiée par le transfert des plantes de jours courts en jours continus (fig. 34). Nous avons déjà vu (fig. 13 et 14) que cette activité recouvre complètement les peroxydases (mises à part les dernières fractions cationiques) et subit une baisse générale durant les 8 heures du jour court. Après 24 ou 48 heures de lumière, l'évolution des AIA-oxydases cesse d'être strictement parallèle à celle des peroxydases (fig. 33). On peut en effet remarquer que l'apparition d'une peroxydase anionique (fraction 12) ne s'accompagne pas de façon concomitante d'une AIA-oxydase et que bien que les dernières fractions peroxydasiques disparaissent l'activité auxine-oxydasique se maintient et s'amplifie dans cette région (fraction 66 à 72). D'autre part, les premières fractions AIA-oxydasiques cationiques subissent une baisse d'activité, comme c'est le cas des peroxydases. On peut dénombrer 5 fractions anioniques et 6 fractions cationiques.

VI. 2. 2. Séparation des peroxydases sur gel d'acrylamide

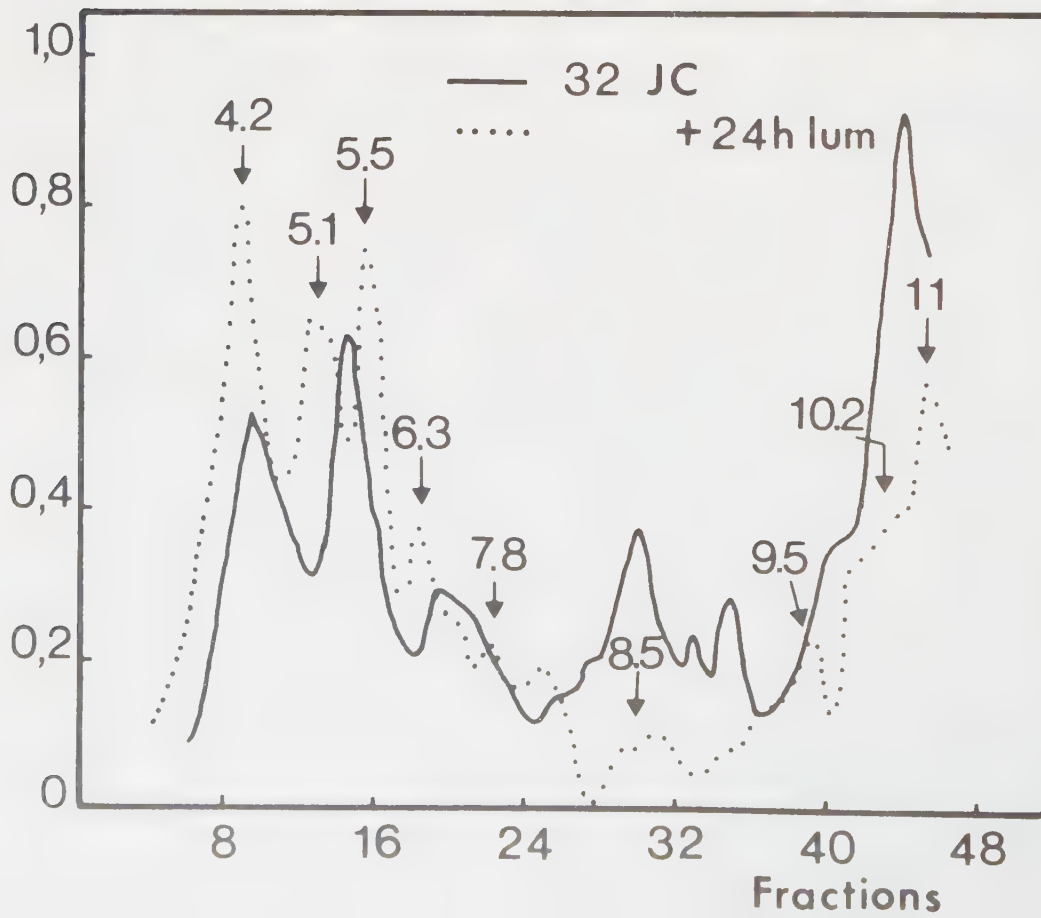
Résultats

Cette technique ne permet pas de mettre en évidence de grands changements dans l'activité peroxydasique après le passage des plantes en lumière continue. Sur les 9 bandes présentes chez l'Épinard à pH 4,3, on en retrouve 7 en jours courts et 8 après 48 heures de lumière (fig. 35). Le transfert provoque dans ce cas l'apparition d'une peroxydase nouvelle, la diminution d'activité de la plus cationique (9) et des moins cationiques (1 et 2).

Fig. 34. Dosage de l'activité AIA-oxydasique lors de la séparation des peroxydases sur gel Sephadex présentée à la fig. 33. Extractions à 8 h le matin au début du 55^e JC et après 24 et 48 h de lumière continue. Le temps d'incubation en présence d'AIA est de 2 h.



A₄₇₀



VI. 2. 3. Séparation des peroxydases par électrofocalisation

Résultats

Les peroxydases séparées par électrofocalisation présente également des différences avant et après l'induction photopériodique. Il suffit de 24 heures de lumière pour apporter des modifications dans la répartition isozymique (fig. 36). Il est évident, comme dans la séparation sur gel Sephadex, que les peroxydases les plus basiques subissent une baisse impor-

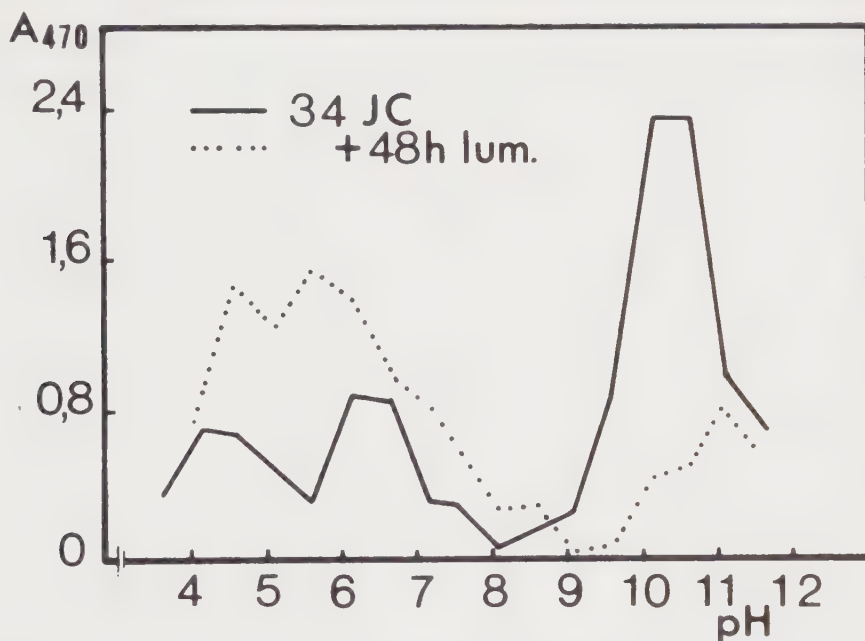


Fig. 37. Représentation des absorptions à 470 nm de la fig. 36 par zones de pH (de 0,5 en 0,5).

tante, alors que les plus acides voient leur activité augmenter. Cette différence apparaît clairement si on exprime dans un graphique l'activité peroxydasique par zones de pH. L'écart de pH choisi dans le cas présenté (pH de 0,5 en 0,5 dans la fig. 37) fait évidemment disparaître la plupart

Fig. 35 (haut). Séparation des peroxydases cationiques sur gel d'acrylamide chez des plantes de 30 JC et de 30 JC + 48 h de lumière. Les extractions sont faites à 8 h le matin.

Fig. 36 (bas). Séparation des peroxydases par électrofocalisation chez des plantes de 32 JC et de 32 JC + 24 h de lumière. Les extractions sont faites à 8 h le matin. Les activités sont mesurées dans chaque fraction.

des pics. Une des premières conséquences du transfert de plantes cultivées en jours courts en lumière continue est donc la modification de la proportion respective des peroxydases acides et des peroxydases basiques. Le rapport des ces deux groupes (a/b), mesuré par électrofocalisation en jours courts et après 1, 2 ou 3 jours de lumière continue est donné dans le tableau V.

TABLEAU V. EVOLUTION DES PEROXYDASES D'EPINARDS EN JOURS COURTS ET APRES TRANSFERT EN LUMIERE CONTINUE. L'ACTIVITE DES PEROXYDASES ACIDES (a: pH 4 à 7) ET BASIQUES (b: pH 7 à 11,5) EST MESUREE APRES ELECTROFOCALISATION ET EXPRIMEE EN ABSORPTION A 470 nm.

	a	b	a/b
34 JC	4,59	3,96	1,16
36 JC + 24 h lumière	6,44	2,44	2,64
38 JC + 48 h lumière	6,51	2,59	2,51
40 JC + 72 h lumière	5,20	2,22	2,34
50 JC	4,51	4,44	1,02

On voit que l'induction photopériodique provoque un net changement du rapport a/b après 24 heures de lumière déjà, c'est-à-dire au moment où l'activité totale des peroxydases a augmenté. Cette augmentation est due aux peroxydases acides, alors que les basiques perdent une partie de leur activité. Une fois en lumière continue, les plantes montrent un rapport a/b en constante diminution. C'est le cas également des plantes restées en jours courts (50 JC). On peut émettre l'hypothèse que cette diminution du rapport est le résultat du vieillissement de la plante.

Mise à part cette modification de la proportion de deux groupes caractéristiques de peroxydases, l'allogement de la photopériode provoque quelques changements qualitatifs. Dans la zone acide, les 2 isoperoxydases

5,3 et 5,8 disparaissent et sont remplacées par 2 pics à pH 5,1 et 5,5 en lumière continue. L'isoperoxydase 4,4 n'est pas toujours présente et il apparaît un pic au pH 4,2. La zone proche de la neutralité entame son développement (pH 7,2). En zone basique, il n'y a pas de différence qualitative.

VI. 3. LES PEROXYDASES BASIQUES

Résultats

Le rythme journalier que présentent les peroxydases basiques en jours courts cesse lorsque les plantes sont soumises à un éclairage continu (fig. 38). En revanche, le rythme des protéines basiques semble se maintenir, au moins temporairement. Les peroxydases entament, elles, une phase d'augmentation d'activité dont le maximum se situe après 32 heures de lumière. L'ampleur de cette augmentation varie selon les plantes. Elle peut atteindre dans certains cas extrêmes 100% de l'activité de jours courts. Il n'a pas été possible de mettre ces variations de réponse en corrélation avec un critère physiologique. Il n'est pas exclu que le passage en lumière continue, en supprimant le rythme caractéristique de jour court, mette en place un rythme différent. Il n'y a pas assez de mesures pour pouvoir se prononcer sur ce point.

Cette évolution des peroxydases basiques ne ressemble pas à celle des peroxydases totales. Elle ne correspond pas non plus à celle observée avec d'autres méthodes de séparation (gel Sephadex, acrylamide, électrofocalisation). Dans ces dernières, les peroxydases basiques -ou cationiques- présentent une diminution d'activité immédiate après le transfert en lumière continue (24 heures de lumière). Les raisons de cette importante différence peuvent être recherchées dans les procédés d'extraction utilisés dans chaque cas, et notamment dans la force ionique et le pH du tampon utilisé. Les figures 39 et 40 montrent le rôle du pH de l'extrait. Ce pH

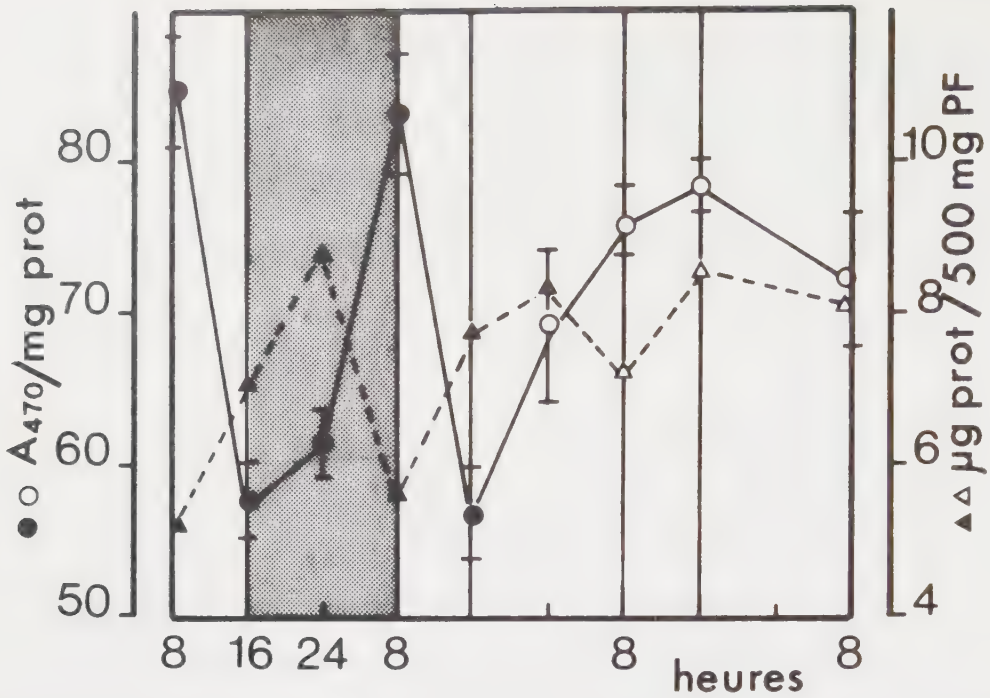


Fig. 38. Evolution des peroxydases ($A_{470}/\text{mg prot.}$) et des protéines ($\mu\text{g prot.}/500 \text{ mg PF}$) basiques extraites à pH 10,5 durant le cycle jour court-nuit longue et après transfert en lumière continue chez *Spinacia* de 42 JC. Chaque point est la moyenne de 6 mesures.

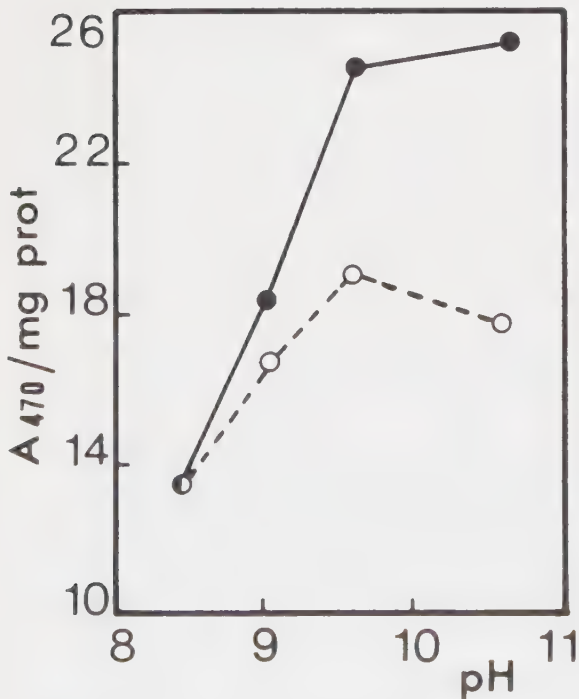


Fig. 39. Effet du pH d'extraction et de séparation sur CM Sephadex C50 sur l'activité des peroxydases basiques chez *Spinacia* de 30 JC et de 30 JC + 72 h lumière.

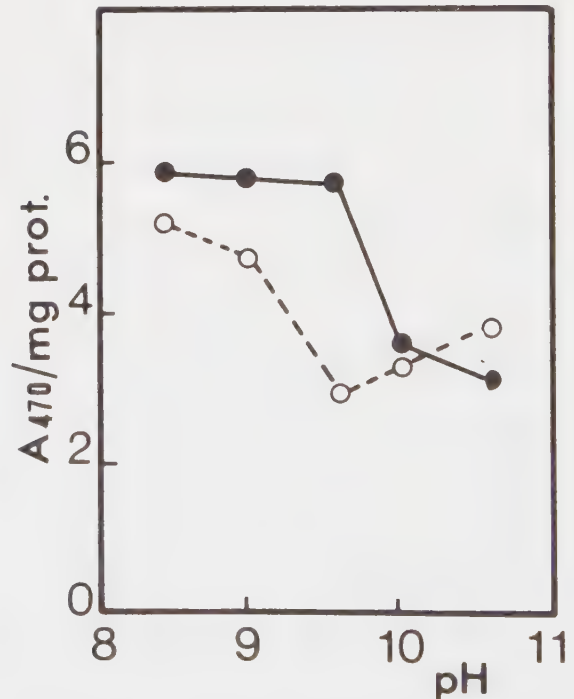


Fig. 40. Effet du pH d'extraction et de séparation sur CM Sephadex C50 sur l'activité des peroxydases non fixées sur la résine (non basiques) chez *Spinacia* de 30 JC et de 30 JC + 72 h lumière.

est obtenu avec des tampons phosphate 0,1 M et ajustés avec NaOH 0,1 pour ceux qui sont supérieurs à 9. On peut comparer l'activité peroxydasique qui se fixe à l'échangeur d'ions (fig. 39) et celle qui demeure soluble (fig. 40). Il apparaît clairement qu'à pH 8,5 les différences entre plantes induites et plantes non induites sont pratiquement nulles. Mais plus le pH augmente, plus le comportement des 2 types de peroxydases diverge. Il y a moins de peroxydases après 72 heures de lumière continue et l'activité semble répartie différemment de celle obtenue en jours courts. Pour les pH supérieurs à 9,5, la quantité de peroxydases qui s'accrochent à la résine baisse et parallèlement celle des peroxydases solubles augmente. Puisque la quantité de protéines basiques qui s'attachent à la résine diminue régulièrement avec l'augmentation du pH, cela signifie qu'après 72 heures de lumière, une partie des peroxydases basiques doit se trouver sous une forme dont le point isoélectrique est proche de 9,5. En jours courts, cette fraction est moins importante. La baisse d'activité des peroxydases solubles en dessus du pH 9,5 est difficile à interpréter. Ces résultats mettent en évidence des différences qualitatives entre les peroxydases basiques de plantes cultivées en jours courts et celles cultivées en lumière continue qui ne sont pas apparentes lors de l'électrofocalisation.

Discussion

La réponse des peroxydases totales et des peroxydases basiques à l'induction photopériodique se manifeste très vite. Après 16 heures de lumière, on observe pour les premières une forte diminution et pour les secondes une augmentation par rapport aux activités correspondantes en jour court à la même heure. D'autre part, le rythme des peroxydases basiques fait place dès le transfert à une phase d'augmentation d'activité qui dure environ 24 heures, alors que les protéines basiques solubles continuent à manifester la même évolution qu'en jours courts, mais de façon atténuée.

Ainsi, lors du transfert en conditions inductrices, on peut discerner une transformation très précoce de l'activité peroxydasique des feuilles d'Epinard. Cette transformation semble intervenir à un moment où l'apex ne présente pas encore les premiers signes perceptibles de l'évocation florale. Les peroxydases remplissent donc l'une des conditions de leur éventuelle participation à l'induction florale, qui est de réagir avant l'apex au changement de photopériode.

Le gain d'activité des peroxydases basiques est intéressant par rapport à l'intervention du métabolisme auxinique dans l'induction florale. Il pourrait en effet correspondre à une destruction accrue de l'auxine défavorable à la floraison.

VI. 4. INDUCTION MIMÉE

Les modifications de l'activité peroxydasique observées lors d'un changement de photopériode qui, par ailleurs, permet à la plante de fleurir, sont-elles comme l'induction florale le résultat d'une modification physiologique irréversible ou simplement d'une adaptation de la plante aux conditions extérieures? Si certaines peroxydases sont liées, d'une façon ou d'une autre, aux remaniements biochimiques accompagnant la floraison, la réponse qu'elles offrent à l'induction doit être définitive, comme l'état induit (Zeevaart, 1962), elle ne peut être répétée une seconde fois. Il nous semble qu'il s'agit là d'une condition nécessaire mais non suffisante pour savoir si les peroxydases sont impliquées dans le déclenchement de la floraison.

Nous avons vu qu'il était possible de mettre en évidence certaines transformations de l'activité peroxydasique, qui surviennent de façon reproductible après le transfert en lumière continue de plantes cultivées en jours courts. Rappelons qu'il s'agit principalement de la disparition de certaines isoperoxydases (5,3 et 5,8), de l'apparition de quelques autres

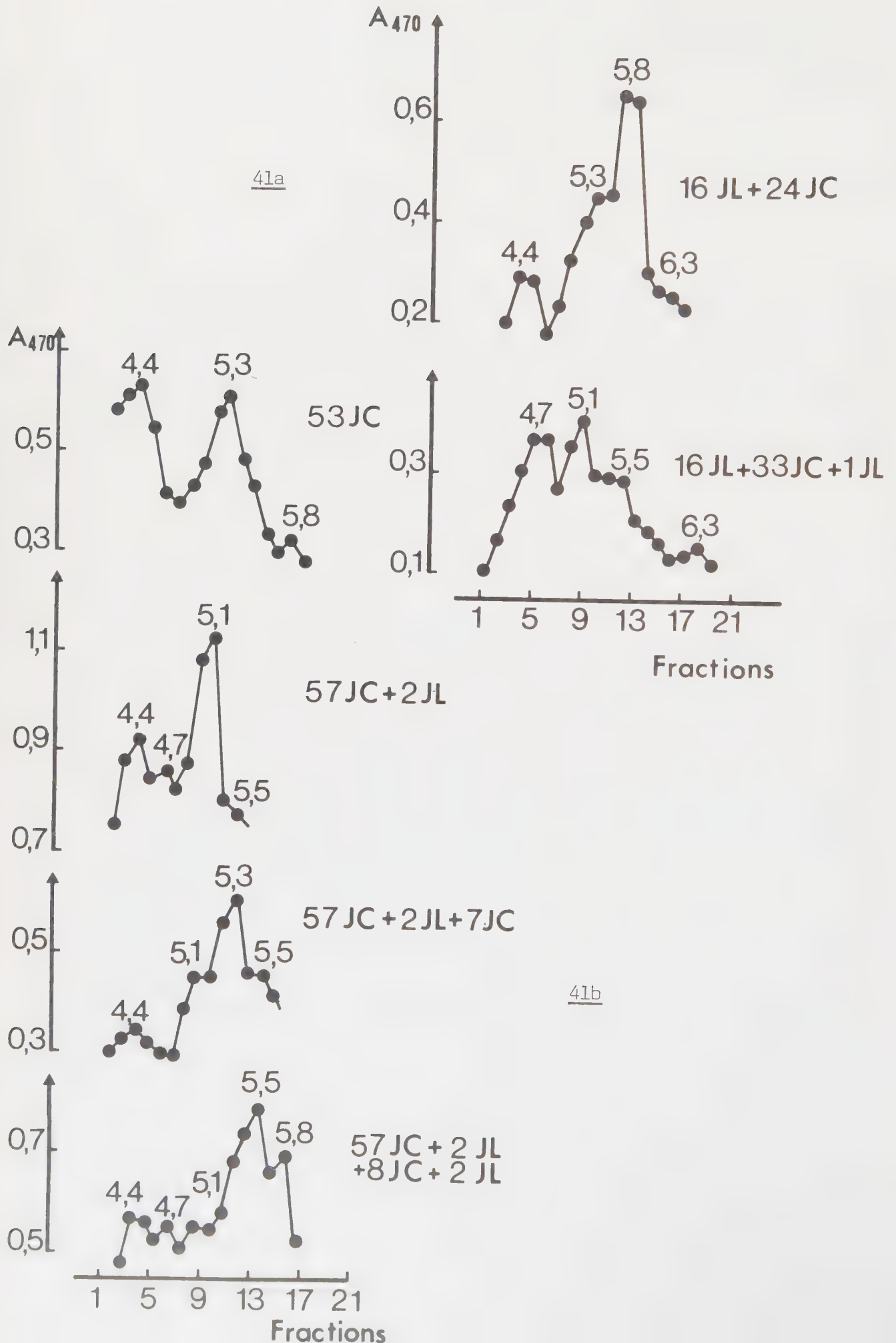
(5,1 et 5,5) et, surtout, d'un changement important dans la proportion des peroxydases acides et basiques, les premières augmentant et les secondes diminuant.

Résultats

TABLEAU VI. EVOLUTION DES ACTIVITES PEROXYDASIQUES DE SPINACIA LORS DE DEUX TRANSFERTS SUCCESSIFS EN LUMIERE CONTINUE. L'ACITIVITE DES PEROXYDASES ACIDES (a: pH 4 à 7) ET BASIQUES (b: pH 7 à 11,5) EST MESUREE APRES ELECTROFOCALISATION ET EXPRIMEE EN ABSORPTION A 470 nm. LA VARIATION DU RAPPORT a/b EST INDIQUEE LORS DE CHAQUE TRANSFERT.

1er transfert				2eme transfert (induction mimée)			
a	b	a/b	%	a	b	a/b	%
40JC	8,95	7,70	1,16	47JC + 2JL +2JC	8,51	5,92	1,44
41JC + 2JL	12,88	7,10	1,81	47JC + 2JL +2JC + 2JL	7,18	7,03	1,02
			+56,0				-29,2
53JC	10,19	7,47	1,36	57JC + 2JL +8JC + 2JL	9,54	11,91	0,80
57JC + 2JL	15,76	10,90	1,46	57JC + 2JL +8JC + 2JL	8,24	16,00	0,51
			+ 7,4				-36,3
				16JL + 24JC	12,51	4,66	2,68
				16JL + 33JC +1JL	9,69	11,69	0,83
							-69,0

Pour savoir si les remaniements rappelés ci-dessus peuvent se produire une seconde fois, nous avons placé des plantes induites (plantes cultivées en jours courts ayant subi une période de lumière continue ou plantes cultivées en jours longs) en jours courts, puis ces plantes ont été remises en jours continus (traitement inducteur mimé ou induction mimée). L'effet de ces opérations sur la proportion des peroxydases acides et basiques est montré dans le tableau VI.



Lors d'un premier passage des plantes de jours courts en lumière continue, le rapport peroxydases acides-peroxydases basiques augmente toujours. L'induction favorise les acides au détriment des basiques. Cette constatation n'est pas valable pour les plantes induites remises en jours courts pendant un certain nombre de jours (tableau VI: 2, 8 et 33 JC) et qui subissent une deuxième induction photopériodique. Les plantes induites et non induites n'ont donc pas le même comportement vis-à-vis du transfert en lumière continue. Pourtant, les expériences présentées au tableau VI montrent que le retour en jours courts de plantes qui ont reçu 2 jours de lumière continue favorise la partie basique. Le rapport a/b baisse, revient presque à sa valeur de jours courts dans un cas et la dépasse dans un autre. Mais il y a quelque chose d'irréremédiablement changé dans le contrôle des peroxydases, car, après 2 ou 8 jours courts, un nouveau passage en lumière continue accentue la progression des basiques au détriment des acides.

Chez des plantes cultivées pendant 16 jours en lumière continue, donc largement induites, l'exposition à des jours courts ne fait guère baisser le rapport a/b. Ce rapport, en revanche, baisse très rapidement grâce à une seule période de lumière de 24 heures (précédée il est vrai de 9 jours courts supplémentaires, mais en jours courts, le rapport se modifie très lentement: voir tableau V). Il y a donc une inversion apparente de la sensibilité des peroxydases à la lumière au moment de l'induction photopériodique. La lumière continue favorise les peroxydases acides au détriment des basiques chez les plantes non induites et agit de façon inverse chez les plantes induites. Chez ces dernières, les transferts de jours courts en lumière continue et de lumière continue en jours courts ont le

Fig. 41a (haut). Séparation des peroxydases acides par électrofocalisation chez des plantes de 16 JL induites mises en JC (16 JL + 24 JC) et soumises à l'induction mimée (16 JL + 33 JC + 1 JL). Les extractions sont faites à 8 heures le matin. Fig. 41b (bas). Séparations des peroxydases acides par électrofocalisation chez des plantes de 53 JC soumises à l'induction (57 JC + 2 JL), remises en JC (57 JC + 2 JL + 7 JC) puis soumises à l'induction mimée (57 JC + 2 JL + 8 JC + 2 JL). Les extractions sont faites à 8 h. le matin.

même effet sur le rapport a/b.

En plus des variations quantitatives les peroxydases acides présentent une évolution qualitative au moment du transfert en lumière continue (JC: 4,4; (4,7); 5,3 et 5,8; après 24 h de lumière: 4,4; 4,7; 5,1 et 5,5). Des épinards de 16 jours longs mis en jours courts pendant 24 jours présentent le profil jours courts (fig. 41a). Une seule période de lumière de 24 heures donnée à des plantes du même lot ayant subi 16 jours longs et 33 jours courts suffit à faire réapparaître les isoperoxydases de jours longs (4,7; 5,1 et 5,5).

Dans une autre expérience (fig. 41b), des plantes ayant subi 53 jours courts, puis 2 jours longs et remises en jours courts pendant une semaine retrouvent partiellement leur profil jours courts. L'isoperoxydase 5,3 est la plus importante, 4,7 a disparu, mais les isozymes de jours longs (5,1 et 5,5) sont toujours décelables. Si ces plantes reçoivent 2 jours longs (induction mimée), 5,5 reprend de l'importance, 4,7 réapparaît, alors que 5,8 est encore présente et que 5,3 s'efface.

VI. 5. RESUME

Le transfert d'Épinards cultivés en jours courts en lumière continue (induction photopériodique) suspend le rythme journalier de l'activité des peroxydases totales aussi bien que celui de l'activité des peroxydases basiques extraites à pH élevé. Après 16 heures de lumière continue, l'activité des premières diminue et celle des secondes augmente par rapport aux valeurs des plantes cultivées en jours courts. D'autre part, le transfert provoque une baisse d'activité des peroxydases basiques et une augmentation d'activité des peroxydases acides séparées par électrofocalisation (augmentation du rapport a/b).

Un certain nombre de remaniements isozymiques sont observés parallèlement. Ceux que révèle l'électrofocalisation ne semblent pas spécifiques de l'induction. En revanche, l'augmentation du rapport a/b observée après

un premier transfert ne se reproduit pas lors d'un second transfert.

En plus de leur activité modifiée, les peroxydases basiques extraites à pH élevé présentent des propriétés différentes vis-à-vis du pH d'extraction et de séparation après une période de lumière continue.

VII. TRAITEMENTS HORMONAUX

Nous avons vu que le transfert d'Epinards de jours courts en jours longs provoque des changements quantitatifs et qualitatifs de l'activité peroxydasique (chapitre V). Parallèlement, on observe une profonde modification de la sensibilité de ces peroxydases à la lumière, mise en évidence par l'induction mimée. Il a été démontré que certaines hormones induisent la floraison en photopériode défavorable et que d'autres au contraire l'inhibent en photopériode favorable (Lang, 1965). Notre propos, dans ce chapitre, est d'examiner l'effet de l'acide gibberellique, de l'acide 3-indolylacétique et de la kinétine sur les peroxydases d'Epinards cultivés en jours courts, puis de transférer ces plantes traitées en lumière continue, afin de savoir si le traitement hormonal interfère avec la photopériode dans le contrôle des peroxydases et s'il produit sur les peroxydases le même effet que sur l'induction florale. Ce plan expérimental devrait nous permettre de savoir si une hormone appliquée en jours courts peut reproduire l'effet de la lumière continue ou au contraire l'empêcher lors du transfert qui suit le traitement.

VII. 1. ACIDE GIBBERELLIQUE

Les gibberellines sont connues pour favoriser et même promouvoir la floraison des plantes de jours longs en conditions photopériodiques suboptimales ou défavorables, surtout chez les plantes qui présentent une montaison en même temps que la floraison (Hillman, 1964). Appliquées à certaines plantes, elles auraient donc la capacité de mettre en route le processus physiologique de la floraison, peut-être en se substituant à la photo-

période longue (Baldev et Lang, 1965; Chaïlakhyan, 1968a et 1968b). En réalité, cette action n'a été observée que dans un certain nombre de cas. Il y a de nombreuses plantes de jours longs sur lesquelles les gibberellines n'ont aucune action florigénique (Lang, 1965).

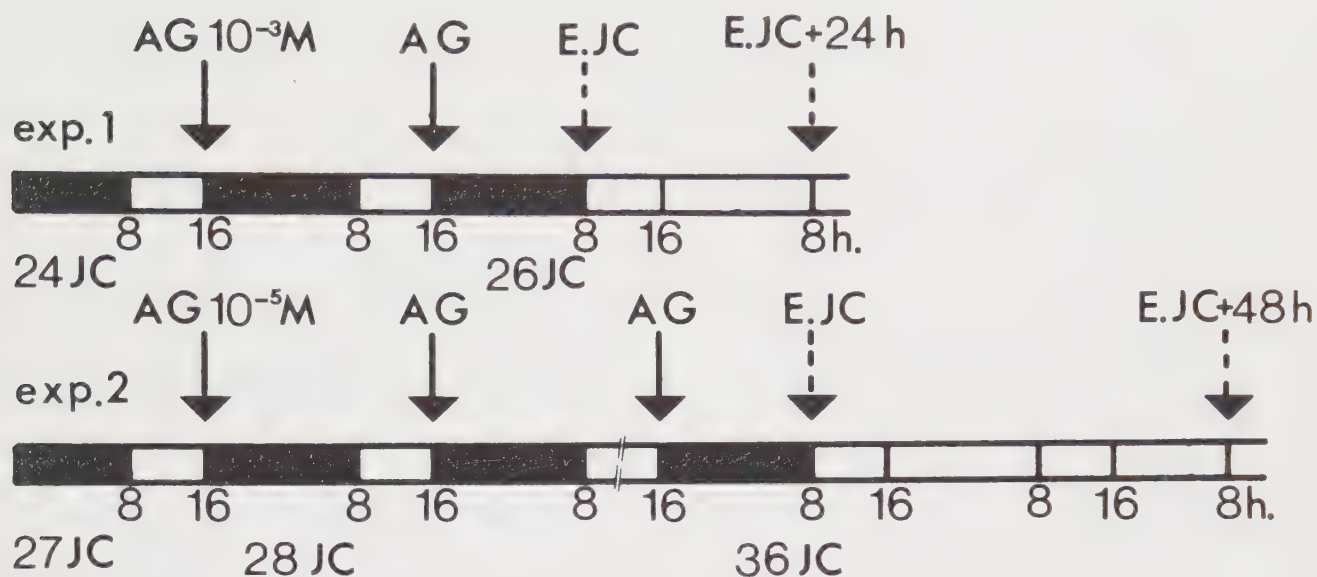
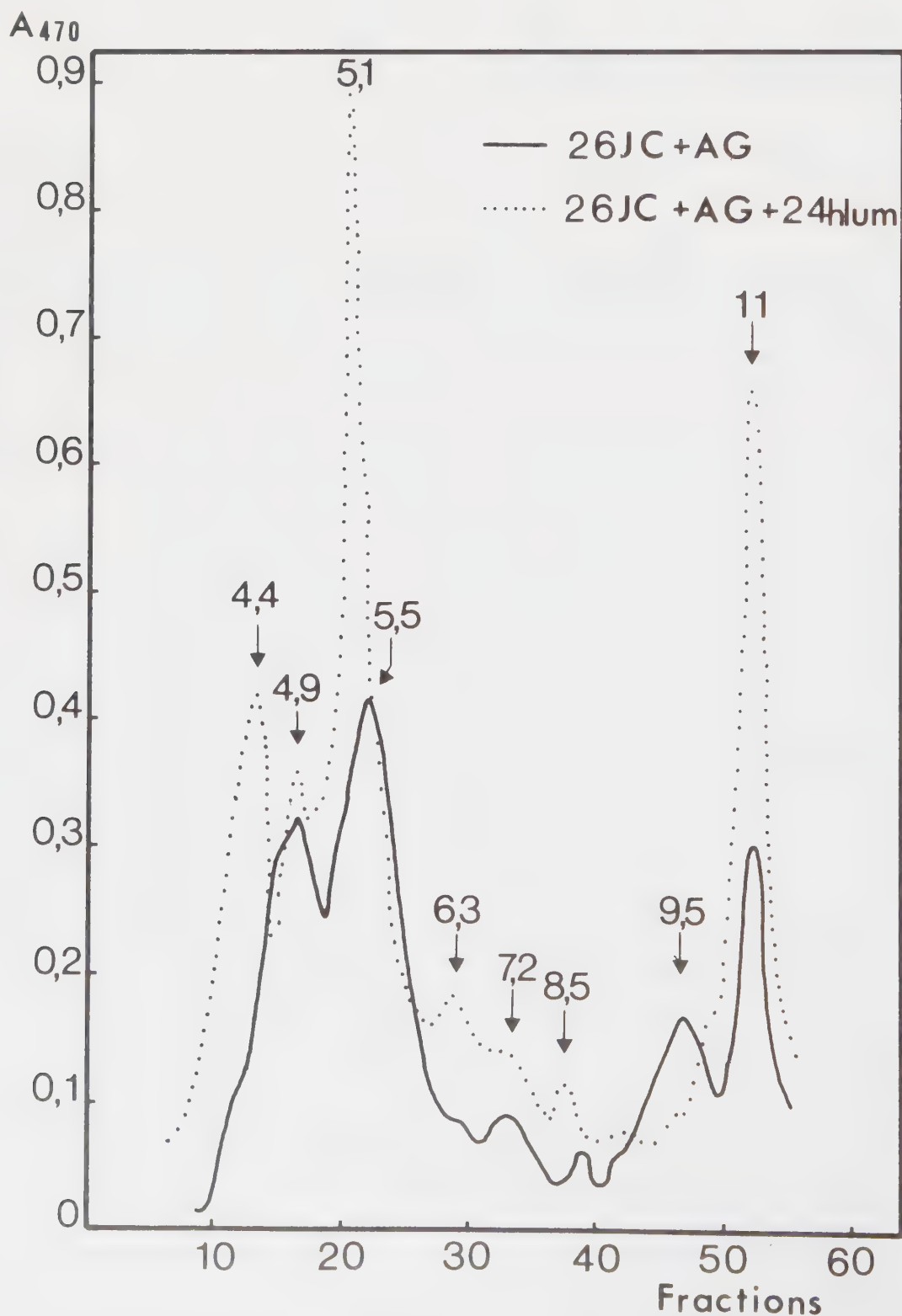


Fig. 42. Schémas expérimentaux du traitement de *Spinacia* avec l'acide gibberellique (AG) et des prélèvements pour l'extraction (E. JC et E. JC + 24 h ou 48 h de lumière) et la séparation des peroxydases par électrofocalisation. L'AG (10^{-3} ou 10^{-5} M) est appliqué aux plantes à la fin du JC par vaporisation sur les feuilles (1 ml par plante).

Si leur participation effective au mécanisme de l'induction florale est douteuse, en revanche il est évident que leur métabolisme est sous le contrôle de la photopériode. Leur biosynthèse et leur dégradation sont plus rapides en jours longs qu'en jours courts chez l'Épinard par exemple. Il y a donc lors du transfert en conditions inductrices une accélération de leur turn-over, sans qu'il apparaisse de nouvelles espèces de gibberellines (Radley, 1970; Zeevaart, 1971a).

L'inhibition des peroxydases et des auxine-oxydases par les gibberellines a été mise en évidence par plusieurs auteurs (Pilet, 1957; Halevy,

1963; Katsumi et Sano, 1968; Galston et Davies, 1969). D'autres n'ont observé aucun effet (Varga et Balint, 1966) ou une activation des AIA-oxydases (Bolduc et al., 1970). L'action des gibberellines sur ces enzymes s'exercerait par l'intermédiaire de leurs effecteurs polyphénoliques (Bouillenne-Walrand et al., 1967). Il semble cependant que seules certaines isoperoxydases soient touchées et que l'âge du tissu traité joue un rôle dans l'efficacité du traitement (Birecka et Galston, 1970).

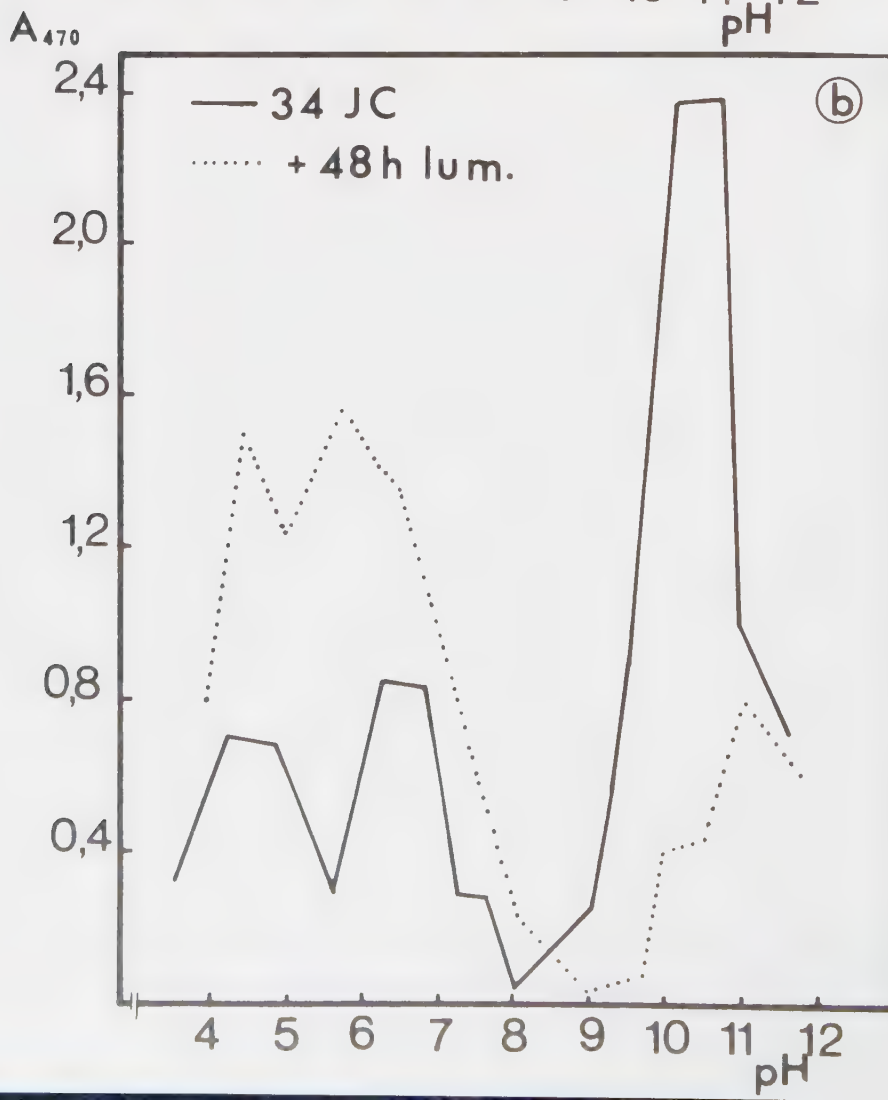
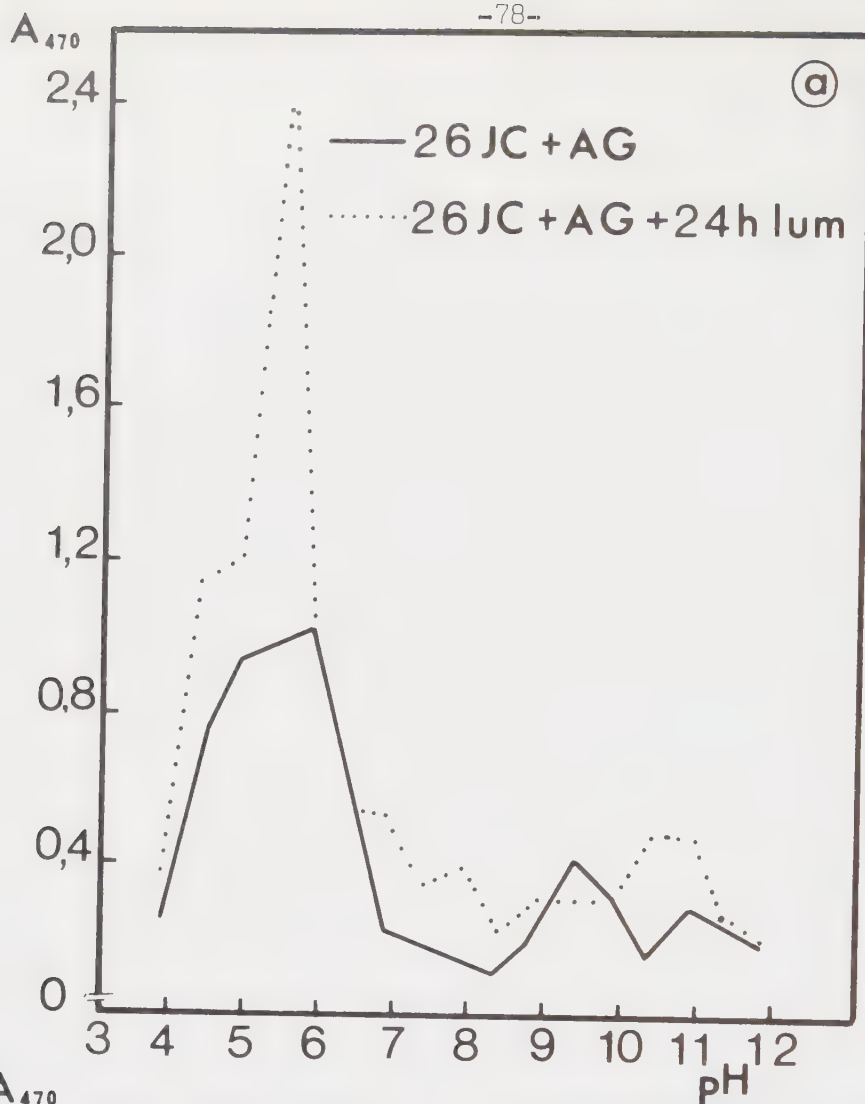


Résultats

Des épinards cultivés en jours courts et traités avec de la gibbérelline présentent au niveau de leurs peroxydases un certain nombre de transformations. Deux expériences différentes donnent des résultats comparables. Le schéma expérimental est donné à la figure 42. Dans les deux cas, les plantes reçoivent 1 ml d'acide gibbérellique (AG) par vaporisation à la fin de 2 ou de 10 jours courts. Au bout de 10 jours de traitement, les plantes présentent un allongement de la tige que l'on n'observe habituellement pas en jours courts. L'électrofocalisation de l'extrait enzymatique montre que l'AG est capable de provoquer chez des plantes placées en jours courts l'apparition d'un profil isoperoxydasique de jours longs (fig. 43): les isoperoxydases 5,3 et 5,8 ne sont pas visibles, mais en revanche 5,5 est bien développée. En jours courts, comme après 24 heures de lumière, on note la présence d'un pic à pH 4,9, rarement présent chez les épinards non traités. Contrairement à ce qui se passe chez ceux-ci, l'induction photopériodique de plantes traitées à l'AG ne provoque pas de modification du rapport a/b, mais plutôt une augmentation générale d'activité. La répartition de l'activité par zone de pH présentée à la figure 44a comparée à celle d'épinards non traités de la figure 44b le montre clairement.

L'activité peroxydasique totale ($A_{470}/\text{mg prot.}$), mesurée avant l'introduction de l'extrait partiellement purifié dans la colonne d'électrofocalisation, est réduite chez les plantes de jours courts traitées à l'AG. Elle retrouve un niveau voisin des témoins après 24 heures ou 48 heures de lumière continue.

Fig. 43. Séparation par électrofocalisation des peroxydases extraites à partir de plantes de 26 JC et de 26 JC + 24 h de lumière traitées à l'AG (10^{-3} M) selon le schéma 1 de la fig. 42. Les extractions sont faites à 8 heures le matin. L'activité peroxydasique est dosée dans chaque fraction.



De ce fait, l'augmentation de cette activité en réponse à l'induction photopériodique se trouve amplifiée. L'AG renforce son action (tableau VII).

TABEAU VII.EVOLUTION DES ACTIVITES PEROXYDASIQUES DE SPINACIA CULTIVES ET TRAITES A L'AG EN JC PUIS TRANSFERES EN LUMIERE CONTINUE. L'ACTIVITE DES PEROXYDASES ACIDES (a: pH 4 à 7) ET BASIQUES (b: pH 7 à 11,5) EST MESUREE APRES ELECTROFOCALISATION ET EXPRIMEE EN ABSORPTION A 470 nm. LA VARIATION DU RAPPORT a/b EST INDIQUEE EN % LORS DE CHAQUE TRANSFERT.

	Durée du traitement AG	a	b	a/b	%	Activité* totale A ₄₇₀ /mg prot
34 JC	-	4,59	3,96	1,16		9,8
+ 24 h lum.	-	6,44	2,44	2,64	+127,6	10,8
26 JC + AG 10 ⁻³ M	2 JC	4,96	2,59	1,92		5,1
+ 24 h lum.	"	7,84	4,29	1,83	- 4,7	8,0
36 JC + AG 10 ⁻⁵ M	10 JC	5,11	2,29	2,23		4,8
+ 48 h lum.	"	4,88	2,29	2,13	- 4,5	10,1

*Mesurée avant électrofocalisation

Des épinards traités en jours courts présentent un rapport a/b élevé, comparable à celui des plantes induites. Lorsqu'ils ont exposés à un ou à deux jours de lumière continue, l'évolution caractéristique des deux groupes de peroxydases n'est pas observée. Au lieu de l'augmentation habituelle lors du transfert, il y a une légère diminution du rapport a/b (tableau VII). L'activité peroxydasique des plantes cultivées en jours courts et traitées à l'AG évolue lors de l'induction photopériodique de façon analogue à celle d'épinards déjà induits et subissant l'induction mimée (tableau VI). La diminution du rapport a/b est cependant moins nette

Fig. 44. Représentation de l'absorption à 470 nm de la fig. 45 par zones de pH (de 0,5 en 0,5). a) avec AG, b) sans AG.

dans le premier cas, comme si les plantes traitées à l'AG étaient moins "induites" que les plantes exposées à 24 heures de lumière.

Discussion

Les résultats présentés ci-dessus doivent être interprétés en tenant compte de l'effet des gibberellines à la fois sur les peroxydases et sur l'induction. En ce qui concerne les peroxydases, leur activité est nettement abaissée en jours courts par l'AG. Cette inhibition, qui avoisine 50 %, correspond aux observations de nombreux auteurs. L'électrofocalisation montre que c'est surtout l'activité des peroxydases basiques qui est affectée par le traitement. Le fait que la répartition isoperoxydasique des épinards traités en jours courts ressemble à celle de plantes cultivées en jours longs indique que l'AG peut non seulement provoquer l'apparition de l'évocation florale de l'apex, mais remplacer aussi la photopériode dans le contrôle des peroxydases.

Il n'est pas impossible que les gibberellines endogènes jouent un rôle dans les événements déclenchés par le passage en lumière continue. Toutefois, les travaux de Zeevaart et de Radley ont montré que ce transfert n'a pas de répercussion spectaculaire sur celles-ci. Il y a cependant une accélération de leur turn-over et on ne peut exclure des modifications de leur compartimentation cellulaire qui augmenteraient leur efficacité biologique au moment de l'induction.

VII. 2. ACIDE 3-INDOLYL ACETIQUE

Il existe évidemment d'étroites relations physiologiques entre les peroxydases et les auxines puisqu'on pense en général que ce sont les peroxydases qui remplissent in vivo le rôle d'auxine-oxydases et qu'elles pourraient participer à la biosynthèse de l'auxine (Riddle et Mazelis, 1964). Le traitement auxinique d'un tissu végétal augmente généralement sa

capacité auxine-oxydasique (Galston et Dalberg, 1954). Toutefois, les relations entre les auxines et ces enzymes ne sont pas aussi simple. Chaque tissu réagit de façon différente (Birecka et al., 1973). La quantité d'auxine administrée est également très importante et toutes les isoperoxydases ne réagissent pas de la même manière. Dans le coléoptile d'Avoine, une isoperoxydase est supprimée par un traitement à l'AIA ou au 2,4-D, alors qu'une autre apparaît (Stuber et Levings, 1969). Dans des cultures de tissus de Tabac, une faible concentration d'auxine (2,4-D ou AIA) favorise le développement d'une auxine-oxydase très anionique et une concentration plus forte l'inhibe complètement alors que d'autres, moins anioniques, voient leur activité croître considérablement (Lee 1971b, 1972). La croissance du tissu suit la même évolution que l'auxine-oxydase la plus anionique. Les moins anioniques sont très actives lorsqu'il n'y a pas de croissance. Le rôle de ces dernières est peut-être de détruire l'auxine. Ricard et Nari (1966) ont montré chez le Navet que c'était ce type d'enzyme (très cationique ou basique) qui pouvait le plus facilement dégrader l'AIA par oxygénation.

On peut noter que chez l'Epinard on retrouve la même dualité entre deux groupes de peroxydases (acides et basiques) que chez le Tabac. Les acides, qui correspondent aux plus anioniques, sont plus actives lorsque la croissance de la tige a lieu (en jours longs ou après induction). La forte activité des peroxydases les plus cationiques (ou basiques) semble caractéristique d'un état de faible croissance (en jours courts).

Résultats

Des plantes qui ont reçu à la fin de 10 jours courts consécutifs 1 ml de solution d'acide 3-indolylacétique 10^{-5} M ne présentent pas de modifications sensibles de leur activité peroxydasique (tableau VIII). L'expérience est conduite selon le schéma expérimental 2 de la figure 42. Dans ces conditions de traitement, les peroxydases acides se trouvent favorisées par rapport aux peroxydases basiques. Toutefois, bien que les plantes

traitées placées en jours courts présentent un rapport a/b élevé, ressemblant à celui des plantes induites ou de jours longs, leur transfert en lumière continue augmente encore ce rapport de près de 90%. Les plantes traitées l'AIA semblent donc aptes à subir l'induction photopériodique, si l'on prend l'activité totale des peroxydases comme critère, bien qu'un tel traitement soit défavorable à la floraison. Il faut noter que les plantes utilisées pour les dosages ne présentent pas de montaison; il n'y a donc pas d'effet marqué sur la croissance.

L'électrofocalisation ne révèle pas par ailleurs de changement notable dans la répartition isoperoxydasique (fig. 45). Les plantes cultivées en jours courts présentent les pics caractéristiques de jours courts et les plantes induites, les pics de jours longs. L'AIA ne fait pas apparaître ou disparaître sélectivement certains d'entre eux.

TABLEAU VIII. EVOLUTION DE L'ACTIVITE PEROXYDASIQUE DE SPINACIA CULTIVE ET TRAITE EN JOURS COURTS A L'ACIDE 3-INDOLYLACETIQUE (AIA) ET A LA KINETINE (kin.) PUIS TRANSFERE EN LUMIERE CONTINUE. L'ACTIVITE DES PEROXYDASES ACIDES (a: pH 4 à 7) ET BASIQUES (b: pH 7 à 11,5) EST MESUREE APRES ELECTROFOCALISATION ET EXPRIMEE EN ABSORPTION A 470 nm. LA VARIATION DU RAPPORT a/b EST INDIQUEE EN % LORS DE CHAQUE TRANSFERT.

	Durée de traitement	a	b	a/b	%	Activité* totale A ₄₇₀ /mg prot
48 JC	-	54,1	51,5	1,05		9,8
+ 48 h lum.	-	71,8	46,9	1,53	+45,7	11,7
50 JC+ AIA 10 ⁻⁵ M	10 JC	56,1	31,7	1,77		9,6
+ 48 h lum.	"	99,7	29,9	3,35	+89,4	6,1
43 JC+ kin. 10 ⁻⁵ M	10 JC	36,4	52,7	0,69		6,1
+ 48 h lum.	"	48,4	76,4	0,63	- 8,7	4,8

* Mesurée avant électrofocalisation

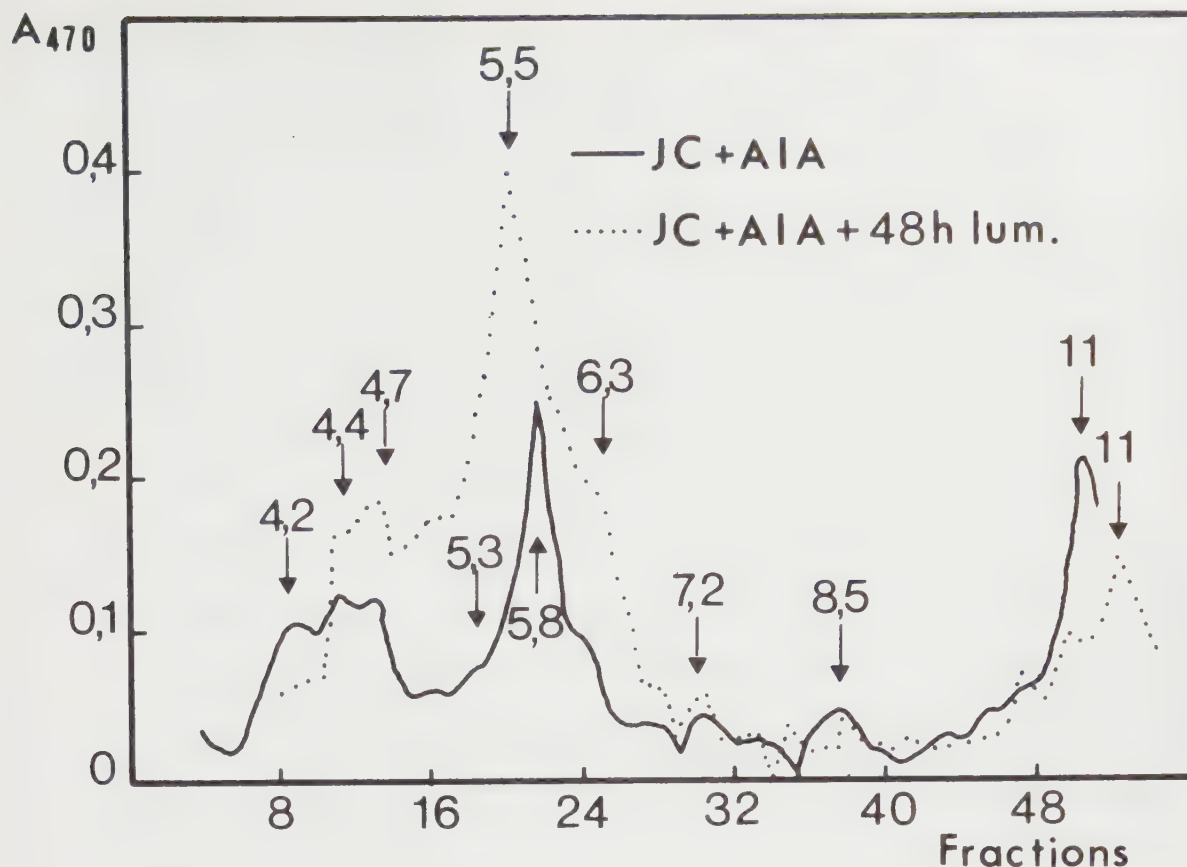


Fig. 45. Séparation par électrofocalisation des peroxydases extraites à partir de plantes de 50 JC et de 50 JC + 48 h. de lumière traitées à l'AIA 10^{-5} M selon le schéma 2 de la fig. 42. Les extractions sont faites à 8 h le matin. Les activités peroxydasiques sont dosées dans chaque fraction.

Discussion

En jours courts, l'AIA n'a pas d'effet sur l'activité totale des peroxydases et ne modifie que très peu le profil isoperoxydasique obtenu par électrofocalisation. Ces observations semblent en contradiction avec les exemples de la littérature présentés au début de ce paragraphe. Il y a cependant une augmentation du rapport a/b qui peut être rapprochée des résultats de Lee, bien que dans notre cas il ne semble pas que le traitement auxinique produise une accélération de croissance. On n'observe en effet pas d'allongement de la tige. Toutefois, la croissance des feuilles n'a pas été mesurée.

L'augmentation du rapport a/b due à l'auxine exogène en jours courts ne confirme pas l'hypothèse d'une participation des peroxydases à l'induction florale, car ce traitement provoque le même effet que la photopériode favorable, bien que l'auxine soit antagoniste de la floraison. Comme d'autre part les plantes traitées présentent lors du transfert en lumière continue une augmentation supplémentaire du rapport a/b, la corrélation entre la floraison et les peroxydases, que semblent indiquer les expériences d'induction mimée et de traitement à l'acide gibberellique, peut paraître douteuse. Cette augmentation pourrait fort bien être le résultat d'un autre effet photopériodique, la montaison par exemple. Il ne faut cependant pas perdre de vue que les peroxydases séparées par électrofocalisation ne représentent qu'une partie des peroxydases des feuilles et que d'autres, les basiques extraites à pH élevé, ont un tout autre comportement lors de l'induction photopériodique. D'autre part, l'application d'auxine durant le transfert et non avant permettrait sans doute d'obtenir d'autres résultats.

VII. 3. LA KINETINE

La kinétine semble favorable à la floraison de certaines plantes de jours courts (Ogawa et Zeevaart, 1967). Chez une plante de jour long, *Lemna gibba*, elle favorise la croissance végétative et n'a guère d'action sur la floraison (Oota, 1965). Dans ce cas, elle n'est active que lorsqu'elle est appliquée en régime lumineux jour/nuit. En lumière continue, elle est sans efficacité. Les cytokinines endogènes semblent d'autre part être inhibitrices de la floraison chez *Scrofularia arguta* (Miginiac et Lacombe, 1973). Il y a peu de travaux concernant leur influence sur les peroxydases. La kinétine augmente leur activité dans les racines de Lentille (Gaspar et Xhaufflaire, 1967) et l'inhibent chez le Topinambour (Gaspar et al.,

1973). Dans des cultures de Tabac, la kinétine et la zéatine à faibles concentrations augmentent considérablement l'activité des peroxydases les plus anioniques (Lee, 1971a). Dans ce cas, comme dans le cas de l'AIA, la concentration de kinétine qui provoque la plus forte croissance cellulaire provoque également la plus forte augmentation d'activité. Ces deux phénomènes sont sensibles à l'action de la cycloheximide et de l'actinomycine D.

Résultats

Chez les Epinards cultivés en jours courts, un traitement avec de la kinétine 10^{-5} M pendant 10 jours (schéma 2, fig. 42) provoque une diminution de l'activité peroxydasique totale (tableau VIII). Lorsque ces plantes sont transférées en jours continus, on n'observe pas l'augmentation d'activité habituelle.

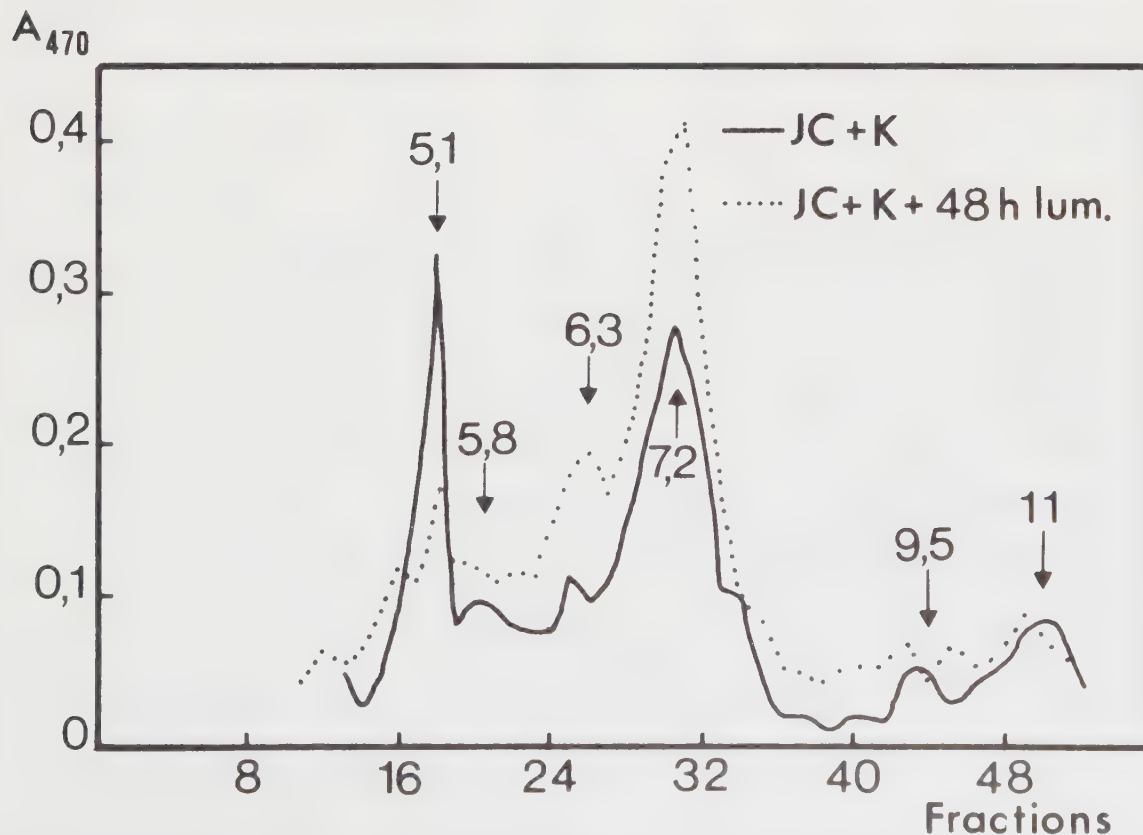


Fig. 46. Séparation par électrofocalisation des peroxydases extraites à partir de plantes de 43 JC et de 43 JC + 48 h de lumière, traitées à la kinétine 10^{-5} M selon le schéma 2 de la fig. 42. Les extractions sont faites à 8 h le matin. L'activité peroxydasique est dosée dans chaque fraction.

En jours courts elles présentent un rapport peroxydases acides/peroxydases basiques extrêmement bas. Le transfert ne le modifie que très peu. Il faut cependant prendre garde au fait que dans ce cas il n'y a pas deux groupes d'isoperoxydases bien distincts. En effet le traitement fait apparaître un pic proche de la neutralité extrêmement important (fig. 46). Ce pic n'est généralement bien développé que chez les plantes mâles. On peut remarquer aussi que les peroxydases basiques sont inhibées par le traitement. Peut-être l'activité généralement située dans les pH alcalins est-elle transférée dans la zone neutre selon un processus inconnu. De façon générale, on remarque que lorsqu'un traitement ou un événement physiologique modifie l'activité d'une ou plusieurs peroxydases, il y a en contrepartie une évolution inverse d'autres isoperoxydases. La kinétine développe aussi en jours courts l'isoperoxydase 5,1, généralement caractéristique des plantes cultivées en jours longs et fait apparaître 5,8 en jours continus.

VII. 4. RESUME

Lorsque des Epinards cultivés en jours courts sont traités avec de l'acide gibberellique, les peroxydases de leurs feuilles présentent les caractéristiques de celles de plantes induites (niveau d'activité, rapport a/b, profil isoperoxydasique, réaction à un transfert en lumière continue). On observe un parallélisme avec la réaction de l'apex.

L'acide 3-indolylacétique administré en jours courts ne provoque pas de changement marqué dans l'activité peroxydasique, si ce n'est dans le rapport a/b. La kinétine, elle, réduit l'activité totales en jours courts et après transfert et elle modifie sensiblement le profil isoperoxydasique.

VIII. LE CONTROLE DE L'ACTIVITE PEROXYDASIQUE PAR LA LUMIERE

VIII. 1. CULTURE EN LUMIERE ROUGE OU BLEUE

Benedict (1971) a montré chez la Tomate que l'activité peroxydase était inversement proportionnelle à l'intensité lumineuse. Il n'y a guère que lui qui a étudié cette activité en fonction de la longueur d'onde de la lumière sous laquelle sont cultivées les plantes. Cette activité présente un maximum dans le vert (500 nm) et dans le rouge sombre (700 nm) et un minimum dans le bleu (430 nm) et dans le rouge (650 nm). Ces données permettent de supposer une participation de la photosynthèse au contrôle des enzymes. Elles montrent en tous cas l'importance de la longueur d'onde de la lumière reçue par la plante.

Des expériences préliminaires ont montré que la lumière bleue augmente la proportion de plantes mâles et que la lumière rouge augmente celle des plantes femelles dans une population d'épinards non sélectionnés, probablement en modifiant dans un sens ou dans l'autre les plantes intersexuées (Greppin, 1965). Une féminisation des plantes peut être obtenue par un traitement auxinique chez le Concombre (Heslop-Harrison, 1957; Galun, 1959), aussi bien que chez l'Epinard. La lumière rouge semble permettre un taux auxinique plus fort dans les plantes, traduit par certains signes morphologiques: feuilles et pétioles très allongés, tiges plus longues, fort développement des rameaux latéraux, féminisation.

Pour nous faire une idée de l'incidence de la qualité de la lumière sur les peroxydases d'Epinard, nous avons cultivé ceux-ci sous des tubes Sylvania bleus (F 40B) et rouges (F 40PK), dans les mêmes conditions qu'en

lumière blanche. Ces tubes fluorescents donnent une lumière qui n'est pas monochromatique, mais fortement enrichie respectivement en lumière bleue et rouge (fig. 47).

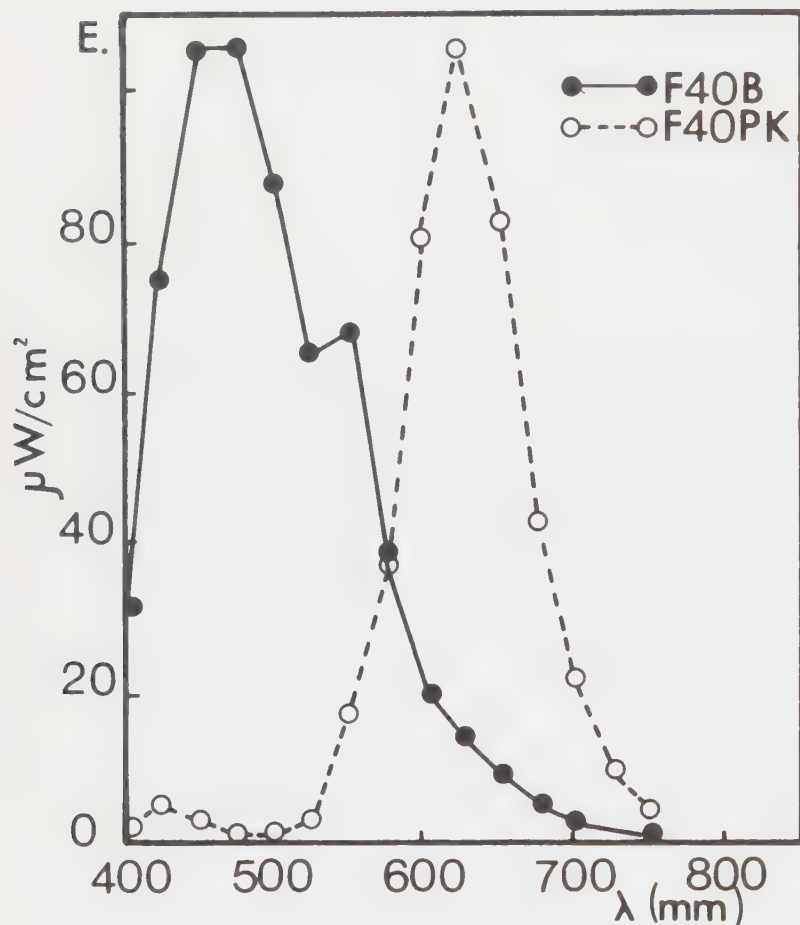


Fig. 47. Spectres d'émission des tubes fluorescents Sylvania bleus (F 40B) et rouges (F 40PK).

Résultats

Les activités peroxydasique et AIA-oxydasique de plantes mâles et femelles cultivées en lumière rouge et bleue sont comparées (fig. 48). Dans ce cas, après extraction, les protéines sont précipitées avec du sulfate d'ammonium (SA). Un premier précipité avec SA 35% (poids/volume) est éliminé et les protéines restantes sont précipitées avec SA saturé. Après dialyse, les activités enzymatiques sont dosées et ramenées au poids frais. Les plantes cultivées en lumière bleue présentent des activités peroxydasique et AIA-oxydasique plus importantes que celles cultivées en lumière rouge. Dans les deux conditions de culture, les mâles ont des activités plus importantes que les femelles, exception faite des peroxydases en lu-

mière rouge. D'autre part, on peut remarquer que chez les femelles l'activité AIA-oxydasique est plus réduite par rapport à l'activité peroxydasique que chez les mâles. Il y a donc une concordance entre le comportement de ces enzymes et ce que l'on sait du rôle de l'auxine dans la sexualisation des plantes dioïques.

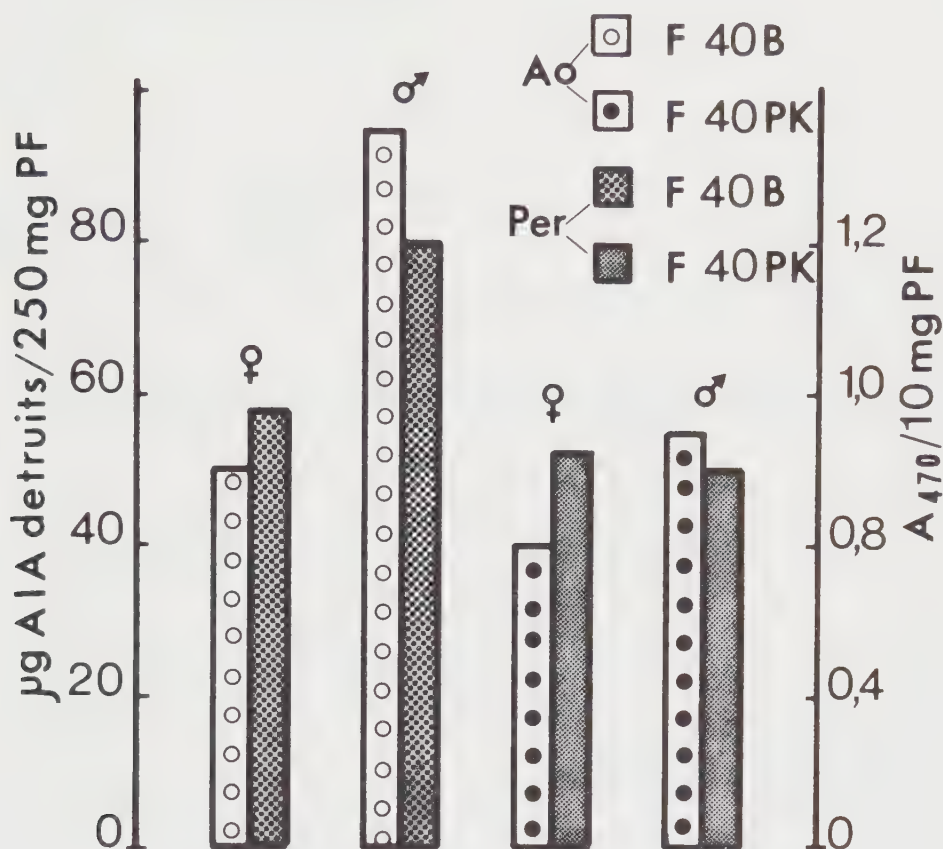


Fig. 48. Activités peroxydasique totale ($A_{470}/10 \text{ mg PF}$) et AIA-oxydasique ($\mu\text{g AIA détruits}/250 \text{ mg PF}$) extraites de feuilles équivalentes (feuilles n° 5 et 6) de *Spinacia* mâle et femelle (tiges de 15 cm, 35 JL) cultivés en lumière bleue (tubes Sylvania F 40B) ou rouge (tubes Sylvania F 40PK).

L'action de la qualité de la lumière est aussi sensible chez des plantes cultivées en jours courts. Elle peut être mise en évidence dans l'expérience suivante. Des fragments de feuilles d'épinards cultivés en jours courts en lumière rouge ou bleue sont immergés dans une solution

d'AIA ($1,5 \cdot 10^{-4}$ M) dans un tampon phosphate pH 6,1 et mis à incuber à l'obscurité. Les feuilles choisies occupent la même place sur la plante et les fragments sont découpés au même endroit. La solution d'AIA stérile contient 100 µg/ml de chloramphénicol. Le tableau IX montre l'évolution de la consommation d'AIA dans chaque milieu. Il confirme que les plantes cultivées en lumière rouge présentent une activité auxine-oxydasique inférieure à celles cultivées en lumière bleue.

TABEAU IX. DESTRUCTION IN VIVO DE L'AIA PAR DES FRAGMENTS DE FEUILLES DE SPINACIA CULTIVE EN JOURS COURTS, EN LUMIERE ROUGE OU BLEUE, EXPRIMEE EN µg D'AIA DETRUIITS.

Temps d'incubation à l'obscurité	lumière bleue	lumière rouge
4 heures	22 µg	22 µg
18	112	27
24	304	109

La séparation sur gels Sephadex (fig. 49 et 50) réalisée à la fin du jour court sur des plantes cultivées en lumière rouge ou bleue permet de retrouver cette différence d'activité. Pour les peroxydases, elle se situe avant tout dans la partie cationique. Mais il n'y a pas de différence qualitative entre les deux types de plantes. C'est la fraction 55 qui semble la plus sensible à la lumière rouge. On peut noter, en comparant avec la figure 13, que les plantes cultivées en lumière rouge et en lumière bleue ont une activité réduite par rapport à celle cultivées en lumière blanche. Les AIA-oxydases, telles qu'elles sont séparées sur les gels Sephadex, présentent aussi des différences. L'activité des plantes cultivées en lumière rouge est généralement inférieure à celle des plantes cultivées en lumière bleue. Les différences qualitatives entre elles ne sont

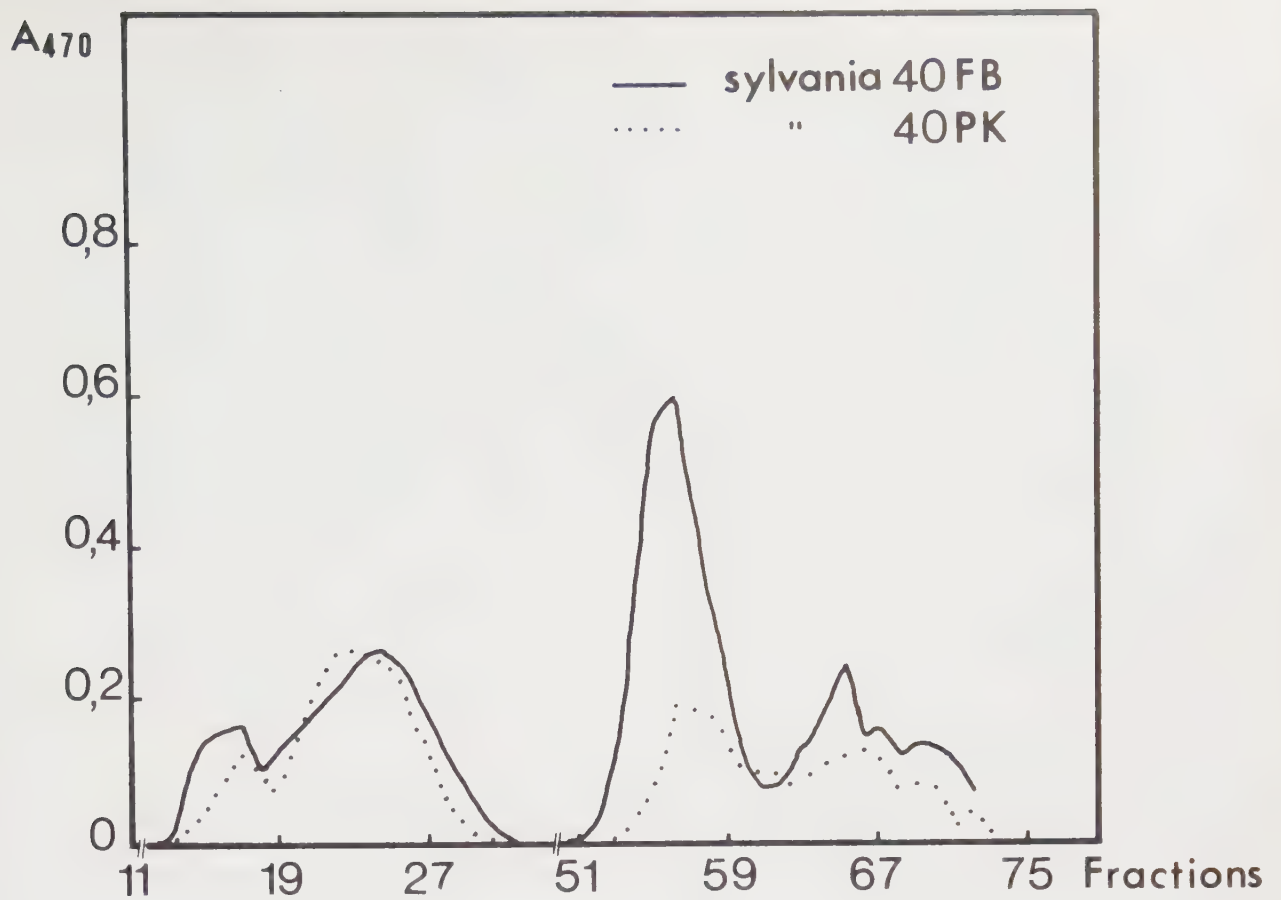


Fig. 49. Séparation des peroxydases sur SE Sephadex C50/Sephadex G100 chez *Spinacia* de 50 JC cultivé en lumière bleue (tubes Sylvania F 40B) et rouge (tubes Sylvania F 40PK). Les extractions sont faites à la fin du JC. L'activité peroxydasique est dosée dans chaque fraction.

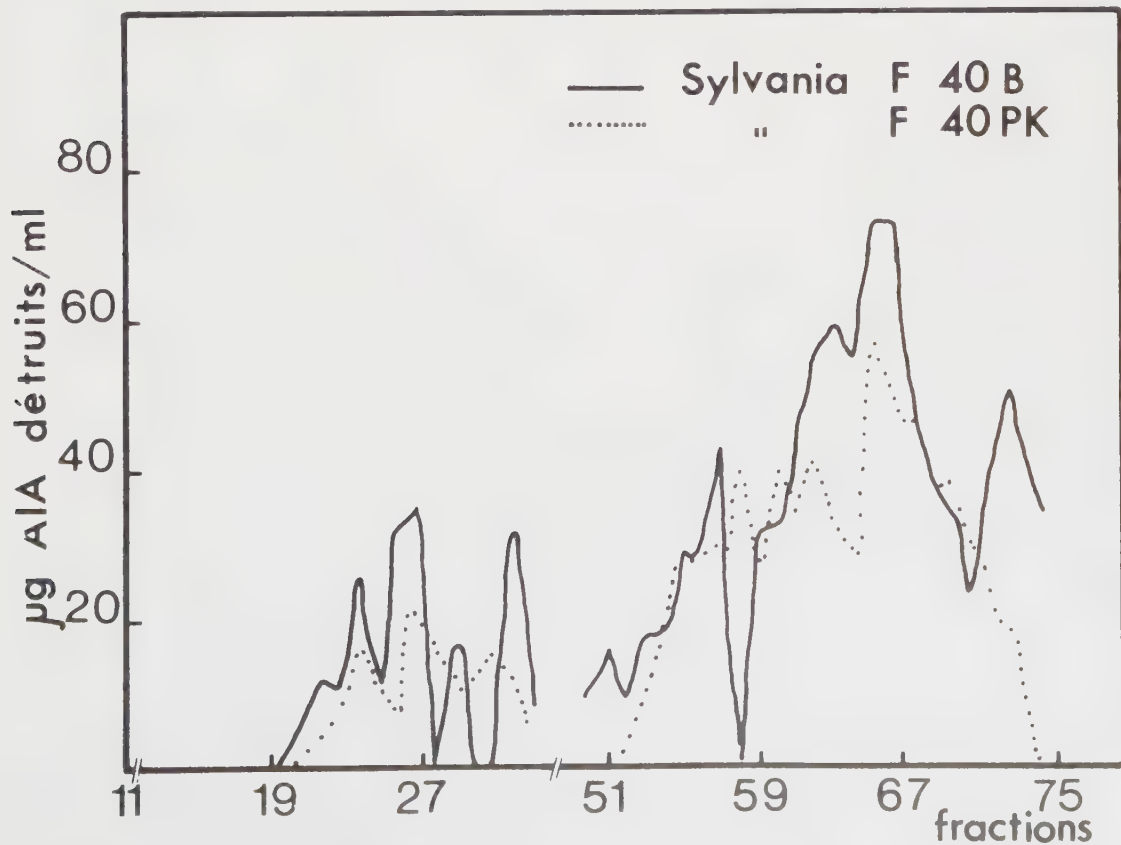


Fig. 50. Activité AIA-oxydasique des diverses fractions collectées (cf fig. 49), exprimée en $\mu\text{g AIA/détruits/ml}$.

pas importantes. En revanche, par rapport aux AIA-oxydases de plantes à la fin du jour court en lumière blanche (fig. 14), on note l'absence des premières fractions anioniques (11-19) et cationiques (51-55). Un pic est présent à la fraction 74 dans les plantes de lumière bleue que l'on retrouve à la fin de la nuit chez des plantes cultivées en lumière blanche.

Dans les résultats présentés ci-dessus, il faudrait tenir compte de l'énergie lumineuse reçue par la plante (4000 lux de lumière bleue ou rouge ne correspondent pas à la même énergie), parce qu'elle est un facteur important dans le contrôle du niveau d'activité peroxydasique.

VIII. 2. LA LUMIERE ROUGE LOINTAIN ET LES PEROXYDASES BASIQUES

Les peroxydases basiques semblent les plus sensibles à la qualité de la lumière. Ce sont elles qui présentent les plus fortes variations journalières dans un cycle jour/nuit. Le transfert en lumière continue modifie leur activité. Toutes ces raisons font qu'il paraît utile de déterminer leur comportement vis-à-vis de phytochrome.

Ce dernier, sous sa forme active P_{fr} , peut avoir plusieurs types d'action sur la biosynthèse des enzymes de plantes. Selon Schopfer (1973), cette biosynthèse est pour certaines enzymes continuellement dépendante de la présence de P_{fr} (photomodulation). Pour d'autres, dont les peroxydases chez *Sinapis*, P_{fr} ne serait nécessaire que pendant une certaine période durant laquelle s'effectue la synthèse d'un intermédiaire qui, ensuite, favorise la production d'enzymes (Schopfer, 1972a). Cet auteur est le seul à avoir étudié le rôle du phytochrome sur l'activité des peroxydases.

L'action de ce pigment s'exerce via les acides nucléiques (Mohr, 1966) et demande plusieurs heures pour se réaliser. Mais P_{fr} peut intervenir directement sur l'activité de quelques enzymes: NAD kinase (Tezuka et Yamamoto, 1972), glucose-6-phosphate deshydrogénase (Manabe et Furuya, 1973) et sur l'utilisation d'ATP (Yunghans et Jaffe, 1972; White et Pike,

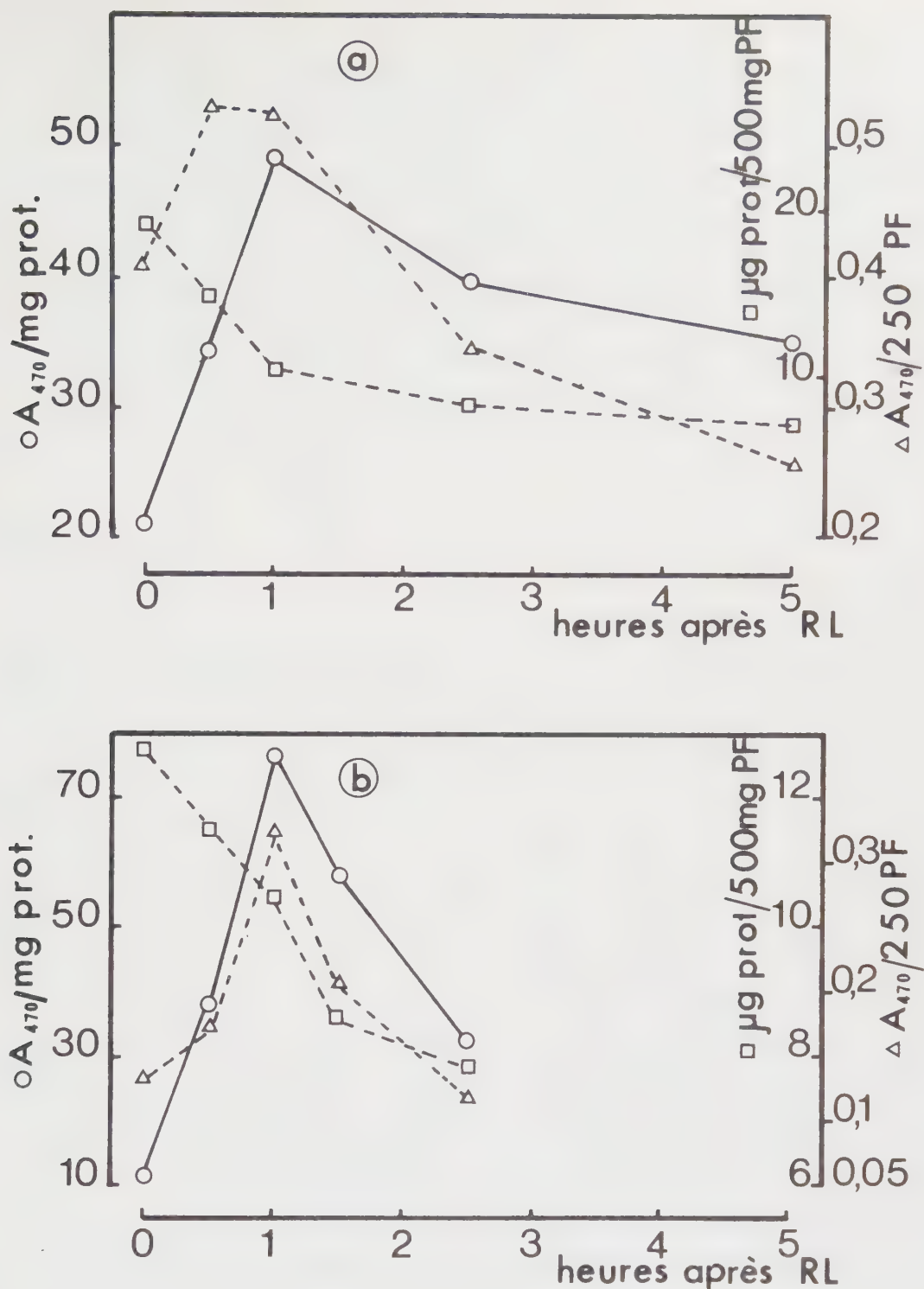


Fig. 51. Evolution des peroxydases basiques ($A_{470}/250\text{ mg PF}$ et $A_{470}/\text{mg prot.}$) et des protéines basiques ($\mu\text{g prot.}/500\text{ mg PF}$) chez *Spinacia* de 18 JL à la suite d'une exposition de 1 heure de RL ($50\text{ uW}/\text{cm}^2$). Les plantes continuent à recevoir 4000 lux de lumière blanche (tubes Sylvania "daylight") pendant et après la période de RL. a et b: 2 expériences différentes.

1974).

En ce qui concerne l'action du phytochrome chez *Sinapis*, il est intéressant de noter la différence de réponse qui existe entre l'hypocotyle

(inhibition) et le cotylédon (promotion). Cela indique qu'à l'intérieur d'une même plante, il peut y avoir deux mécanismes opposés pour la régulation des peroxydases par la lumière (Schopfer et Plachy, 1973). Cette constatation peut être rapprochée de l'évolution différente du rapport des peroxydases acides sur les peroxydases basiques suivant que les Epinards sont induits ou non. Dans ce cas aussi, nous pourrions avoir deux mécanismes de régulation différents, traduits par des sensibilités opposées à la lumière.

Résultats

Des plantes cultivées en jours longs, auxquelles on administre pendant une heure un éclairage rouge lointain ($50 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ à 730 nm) en plus de la lumière blanche habituelle, présentent dans les heures qui suivent, des modifications tant des peroxydases que des protéines basiques (fig. 51). L'activité des peroxydases basiques augmente. Elle atteint un maximum dans les deux cas présentés environ 1 heure après la fin du traitement RL. Son évolution est la même, qu'elle soit comparée au poids frais ou aux milligrammes de protéines basiques. Celles-ci suivent une évolution différente. Leur quantité diminue, d'abord rapidement, puis de façon atténuée. Après 24 heures, les effets du RL ne se font plus sentir.

Les peroxydases ont donc la capacité d'être stimulées par la lumière rouge lointain. Le délai qui s'écoule entre le début de l'exposition au RL et le maximum de la réponse (environ 2 heures) rend possible la néosynthèse de peroxydases, comme c'est le cas chez *Sinapis*. Mais on ne peut exclure l'activation de peroxydases préexistantes.

Celles-ci réagissent en effet de façon extrêmement rapide à l'application de lumière rouge ou rouge lointain. Cela peut être démontré par un type d'expérience que nous avons souvent utilisé. Les plantes sont exposées pendant 2 minutes à une lumière rouge lointain. Trois minutes après la fin

(inhibition) et le cotylédon (promotion). Cela indique qu'à l'intérieur d'une même plante, il peut y avoir deux mécanismes opposés pour la régulation des peroxydases par la lumière (Schopfer et Plachy, 1973). Cette constatation peut être rapprochée de l'évolution différente du rapport des peroxydases acides sur les peroxydases basiques suivant que les épinars sont induits ou non. Dans ce cas aussi, nous pourrions avoir deux mécanismes de régulation différents, traduits par des sensibilités opposées à la lumière.

Résultats

Des plantes cultivées en jours longs, auxquelles on administre pendant une heure un éclairage rouge lointain ($50 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ à 730 nm) en plus de la lumière blanche habituelle, présentent dans les heures qui suivent, des modifications tant des peroxydases que des protéines basiques (fig. 51). L'activité des peroxydases basiques augmente. Elle atteint un maximum dans les deux cas présentes environ 1 heure après la fin du traitement RL. Son évolution est la même, qu'elle soit comparée au poids frais ou aux milligrammes de protéines basiques. Celles-ci suivent une évolution différente. Leur quantité diminue, d'abord rapidement, puis de façon atténuée. Après 24 heures, les effets du RL ne se font plus sentir.

Les peroxydases ont donc la capacité d'être stimulées par la lumière rouge lointain. Le délai qui s'écoule entre le début de l'exposition au RL et le maximum de la réponse (environ 2 heures) rend possible la néosynthèse de peroxydases, comme c'est le cas chez Sinapis. Mais on ne peut exclure l'activation de peroxydases préexistantes.

Celles-ci réagissent en effet de façon extrêmement rapide à l'application de lumière rouge ou rouge lointain. Cela peut être démontré par un type d'expérience que nous avons souvent utilisé. Les plantes sont exposées pendant 2 minutes à une lumière rouge lointain. Trois minutes après la fin

d'un lot de plantes à l'autre. Il faut souligner d'autre part qu'il est difficile d'administrer la même dose de lumière à chaque plante, ne serait-ce qu'en raison de l'orientation différente de leurs feuilles qui offrent une surface variable aux rayons lumineux. Mais on peut rappeler que l'écart maximum entre les valeurs de 2 plantes témoins broyées au même moment est de 4 %.

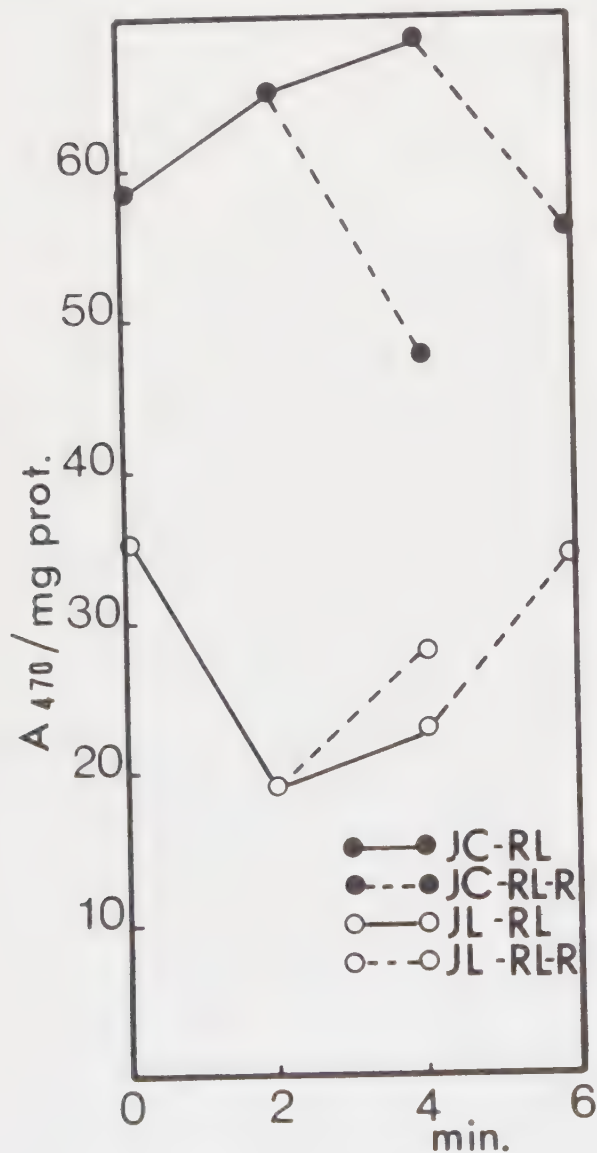


Fig. 53. Effet de 2 ou de 4 min de RL ($70 \mu\text{W}/\text{cm}^2$) suivies de 2 min de R ($70 \mu\text{W}/\text{cm}^2$) sur l'activité des peroxydases basiques chez Spinacia (5 feuilles à 35 JC et 6 feuilles à 20 JL). Les traitements lumineux et les mesures sont effectués au début du JC et à la même heure pour les plantes en JL (expériences répétées 15 fois).

La figure 52 montre que les plantes cultivées en jours longs répondent à 2 minutes de RL par une diminution d'activité mesurée 3 minutes après la fin du traitement. Celles de jours courts présentent une augmentation d'activité pour les énergies les plus faibles et une diminution pour les plus fortes. Il s'agit d'une différence essentielle entre les plantes induites et non induites sur laquelle nous reviendrons plus loin.

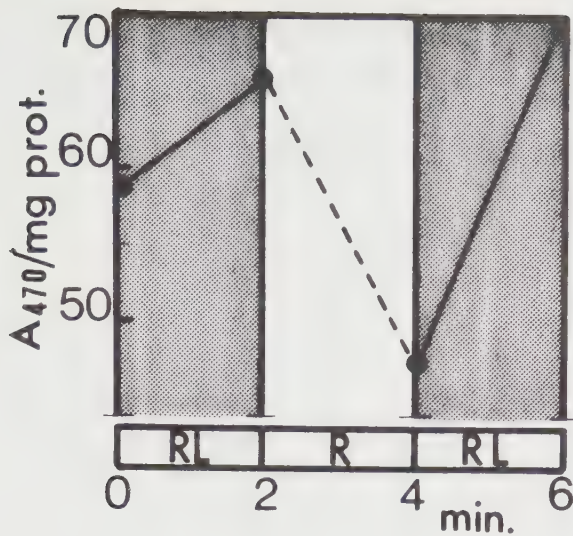


Fig. 54. Effet de la séquence RL-R-RL sur l'activité des peroxydases basiques au début du 35^e JC. RL et R: 70 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$.

L'intervention du phytochrome est clairement démontrée lorsque l'on applique 2 minutes de lumière rouge aux plantes qui ont reçu 2 minutes de rouge lointain (fig. 53) ou lorsque des plantes cultivées en jours courts reçoivent la séquence RL-R-RL (fig. 54). Chez ces plantes, RL et R ont des effets antagonistes. Chez les plantes cultivées en jours longs également, mais la diminution d'activité due au RL fait place plus ou moins rapidement à une augmentation.

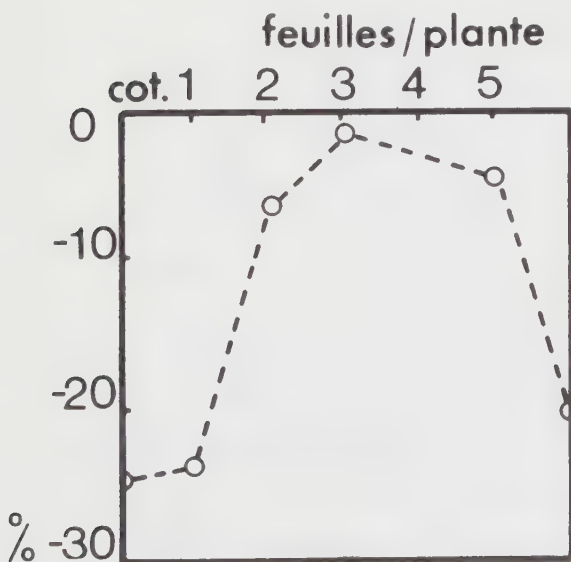


Fig. 55. Effet de 2 min de RL (70 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$) sur les peroxydases basiques de Spinacia cultivé en JL en fonction du stade de développement (nb de feuilles par plante). Les éclairs de RL et les mesures sont effectués à 8 h le matin. Les résultats sont exprimés en % de variation par rapport à l'activité de plantes témoins. Chaque point est la moyenne de 4 valeurs.

On peut constater que ce comportement de peroxydases est lié à l'âge de la plante ou à son état physiologique. Lorsque l'on compare la réponse des peroxydases basiques de plantes cultivées en jours longs à une même dose de RL, on s'aperçoit qu'elle dépend du stade de développement (fig. 55). Pour 70 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ de RL, la diminution d'activité est minimum chez

des plantes de 3 ou 4 feuilles. On obtiendrait une autre courbe avec une autre dose de RL. Le contrôle de l'activité des peroxydases basiques, comme le niveau de cette activité, montre une certaine corrélation avec l'apparition de l'état induit de l'apex.

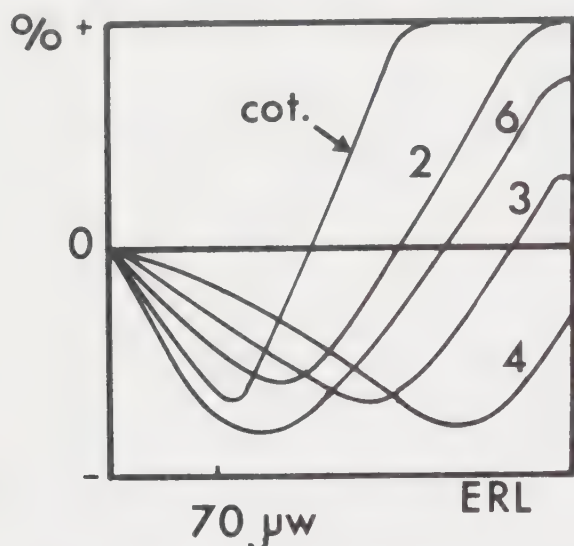


Fig. 56. Evolution supposée de l'activité des peroxydases basiques de *Spinacia* en JL (stades cotylédons, 2, 3, 4, 6 feuilles), en réponse à des doses croissantes de RL administrées en 2 min, exprimée en % de variation par rapport à l'activité de plantes témoins.

La réaction de cette activité à la lumière RL passe par une étape particulière au moment où la plante devient induite: c'est le stade de la plante où la phase de diminution est la plus importante. Avant et après ce stade, la diminution est forte pour les faibles doses (par exemple 70 µW) et, lorsque la dose augmente, il y a rapidement une augmentation d'activité. Au stades 3, 4 ou 5 feuilles, la diminution d'activité est faible pour les faibles doses et ne cesse de s'accroître lorsque l'énergie augmente. Les données en notre possession pour le moment ne permettent pas de construire avec sûreté les courbes de réponses en fonction de l'énergie pour chaque stade de développement de la plante en jours longs. Mais les résultats fragmentaires déjà obtenus indiquent que ces courbes auraient l'allure de celles, en parties construites, de la figure 56.

En jours courts, la courbe continue est inversée par rapport à celle de jours longs. Cela n'est vrai cependant que lorsque le test est réalisé à la fin de la nuit ou au début du jour court. Durant la photopériode, la réponse des peroxydases basiques évolue et finit par ressembler à

celle de plantes de jours longs, soit très jeunes, soit très âgées (fig. 57). Dans l'alternance jour-nuit, la réponse immédiate des peroxydases ba-

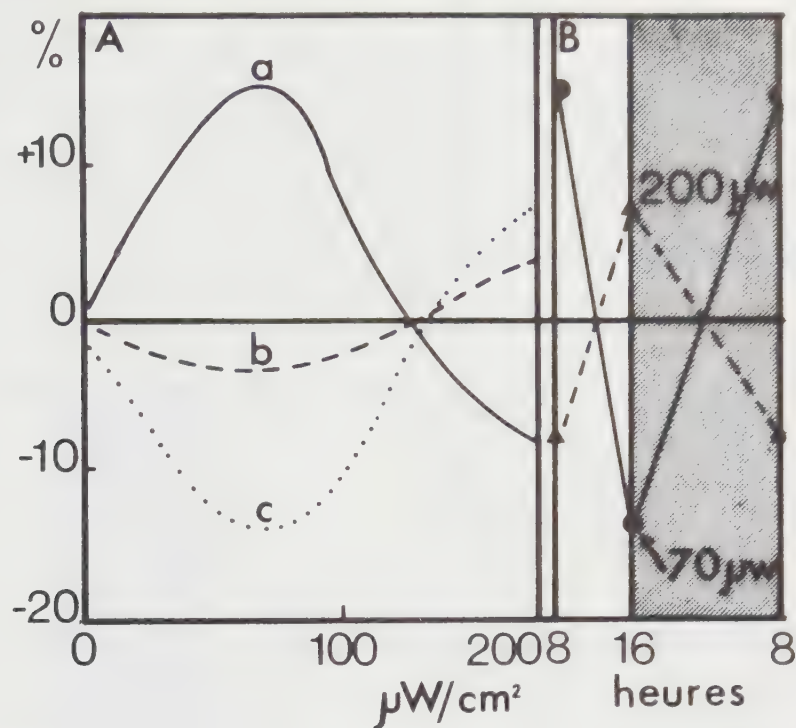


Fig. 57A. Effet de doses croissantes de RL administrée en 2 min sur l'activité des peroxydases basiques de *Spinacia* en JC. Les éclairs de RL et les mesures sont effectués au début (a), au milieu (b) et à la fin (c) du 30^e JC. Les résultats sont exprimés en % de variation par rapport à l'activité de plantes témoins prélevées au même moment. 57B. Structure temporelle de la réponse des peroxydases basiques à 2 min de RL (70 et 200 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$) même expérience que A.

siques à un éclair de RL subit des variations liées à la photopériode. A chaque dose correspond une courbe particulière. Chaque point figuré sur la figure 57 indique, rappelons-le, la variation en % de l'activité des peroxydases basiques, par rapport à celle de plantes témoins, consécutive à 2 minutes de RL. Il apparaît donc que la nature et l'amplitude de la variation dépendent de l'énergie à 730 nm d'une part, du moment auquel le test est réalisé d'autre part. Entre le début et la fin de la photopériode, la réponse est complètement inversée.

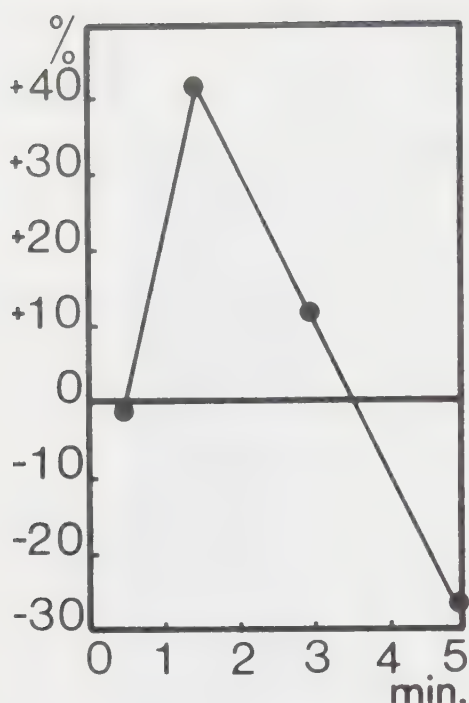


Fig. 58. Evolution de l'activité des peroxydases basiques en fonction du temps qui s'écoule après les 2 min de RL ($70 \mu\text{W}/\text{cm}^2$) chez *Spinacia* au début du 32^e JC. Mesures exprimées en % de variation par rapport à des plantes témoins prélevées au même moment (expérience répétée 4 fois).

Une difficulté empêche cependant de parvenir à une explication simple de ce qui a été observé ci-dessus. La même cause (RL) semble en effet produire des résultats différents (augmentation ou diminution de l'activité des peroxydases basiques). Une expérience rendue possible par l'amélioration des conditions matérielles de travail permet, semble-t-il, de lever cette difficulté. Il suffit de raccourcir le temps qui sépare la fin du traitement RL du broyage des feuilles. Dans ce cas on s'aperçoit que les plantes cultivées en jours courts présentent, avant l'augmentation, une légère diminution d'activité (fig. 58). Ainsi, les peroxydases basiques auraient en toutes circonstances le même type de comportement vis-à-vis de la lumière RL. Mais les variations quantitatives seraient très différentes suivant le moment de la photopériode, si bien qu'en effectuant le test à un moment particulier (5 minutes après le début du traitement RL), on observe une différence de réaction entre les plantes cultivées en jours courts et en jours longs.

VIII. 3. L'INDUCTION PHOTOPERIODIQUE ET LA REPONSE DES PEROXYDASES BASIQUES AU ROUGE LOINTAIN.

Les peroxydases basiques de feuilles de plantes cultivées en jours courts montrent un rythme de sensibilité à un éclair de lumière rouge lointain qui suit le cycle jour-nuit. Lorsque de telles plantes sont transférées en lumière continue, le rythme disparaît (fig. 59).

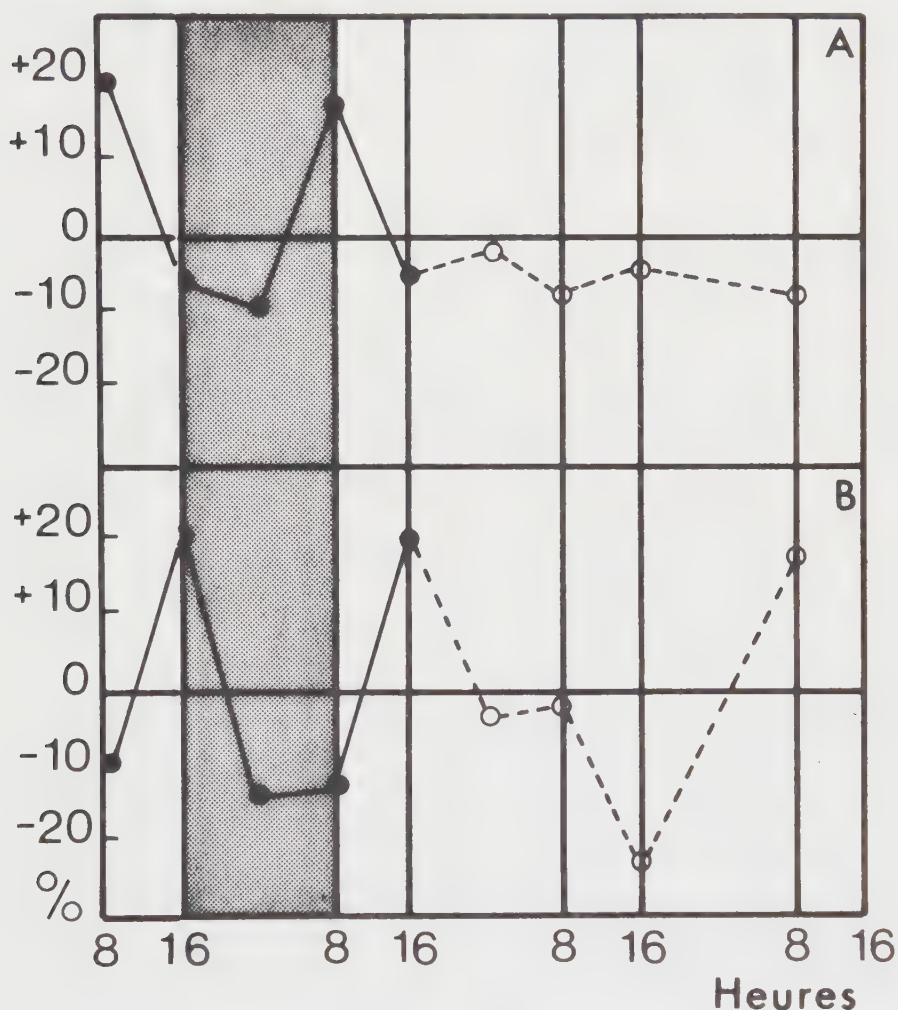


Fig. 59. Structure temporelle de la réponse des peroxydases basiques à 2 min de RL (A: 70 $\mu W/cm^2$; B: 200 $\mu W/cm^2$) en JC et après transfert en lumière continue. Les résultats sont exprimés en % de variation par rapport à l'activité de plantes témoins prélevées en même temps.

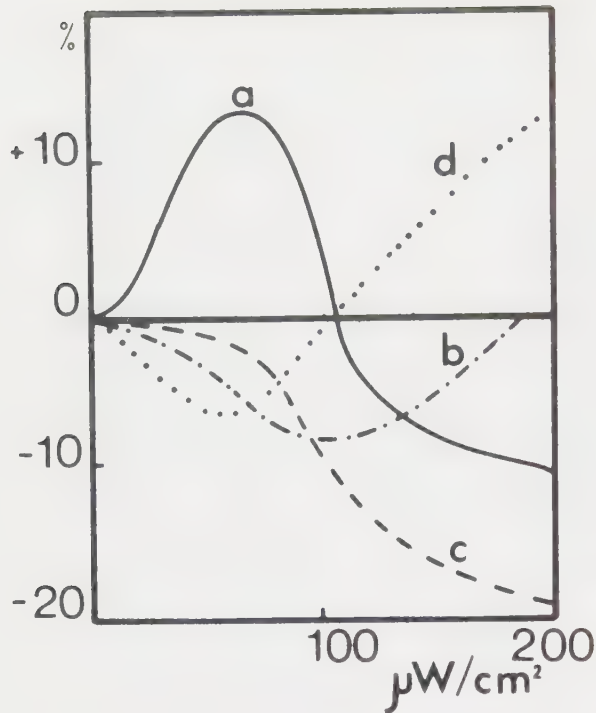


Fig. 60. Effet de doses croissantes de RL administrées en 2 min sur l'activité des peroxydases basiques. Les éclairs de RL et les mesures sont effectués au début du 32^e JC (a) et après 24 (b), 32 (c) et 48 h (d) de lumière continue. Les résultats sont exprimés en % de variation par rapport à l'activité de plantes témoins prélevées au même moment.

Pour 70 et 200 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ à 730 nm, on observe une diminution d'activité à toutes heures. Cette diminution d'activité est la plus importante 32 heures après le début de la phase de lumière continue (fig. 60). Ces résultats suggèrent que les peroxydases réagissent en toutes circonstances en fonction de la valeur du rapport $P_{\text{fr}}/P_{\text{tot}}$ présent dans les cellules au moment du test. Cependant, l'expérience suivante montre que l'induction photopériodique modifie de façon durable les liens physiologiques entre les peroxydases basiques et le phytochrome. Des plantes cultivées en jours courts subissent l'induction photopériodique (24 ou 48 heures de lumière) puis sont exposées à un ou deux jours courts. Après la période de lumière continue, l'éclair de lumière RL provoque la baisse d'activité attendue. Mais lorsque les plantes sont remises en jours courts, la réponse des peroxydases au RL est atténuée (après 24 heures de lumière) ou inversée (après 48 heures de lumière). Les plantes ayant subi une complète induction photopériodique réagissent au RL après 16 heures d'obscurité comme si elles étaient restées à la lumière (tableau X).

Nous avons vu que les peroxydases basiques (extraites à pH élevé) et les peroxydases totales (extraites à pH neutre) subissent une élévation d'activité lors d'un transfert de jours courts en lumière continue, sensi-

TABLEAU X. EFFET DE 2 MINUTES DE ROUGE LOINTAIN SUR L'ACTIVITE DES PEROXYDASES BASIQUES DE SPINACIA CULTIVE EN JOURS COURTS (30 JC) ET AYANT RECU DIFFERENTS TRAITEMENTS PHOTOPERIODIQUES.

	A ₄₇₀ / mg prot.		% variation
	Témoins	+70 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ à 730 nm	
30 JC	63	71	+12,7
30 JC + 24 h lumière	78	71	- 9,0
30 JC + 24 h lumière + 1 JC	76,8	80,5	+ 4,8
30 JC + 24 h lumière + 2 JC	76	80	+ 5,3
30 JC + 48 h lumière	80	74	- 7,5
30 JC + 48 h lumière + 1 JC	81	79	- 2,5

Les 2 min de RL sont appliquées à la fin du traitement photopériodique, à 8 h le matin (début JC). Les dosages sont effectués 3 min après.

ble déjà après 24 heures de lumière. Si cette période de lumière est coupée aux deux tiers (à minuit) par un éclair de RL de diverses durées, l'élévation d'activité est inhibée (fig. 61). Les peroxydases totales et les peroxydases basiques ont un comportement distinct. L'augmentation d'activité des premières est inhibée par des éclairs de RL de faible durée (5 à 10 minutes). En revanche, elle est accentuée par un éclair plus long (30 minutes). Les peroxydases basiques, elles, sont bloquées par un éclair de RL de façon presque identique, quelle que soit sa durée (5 à 30 minutes). La différence entre les deux activités est peut-être due au peroxydases acides. On ne peut cependant exclure pour les peroxydases totales l'intervention d'effecteurs positifs qui devraient être éliminés lors de la séparation des basiques. Il n'en demeure pas moins que les deux groupes d'isoperoxydases se comportent de nouveau de façon extrêmement différente.

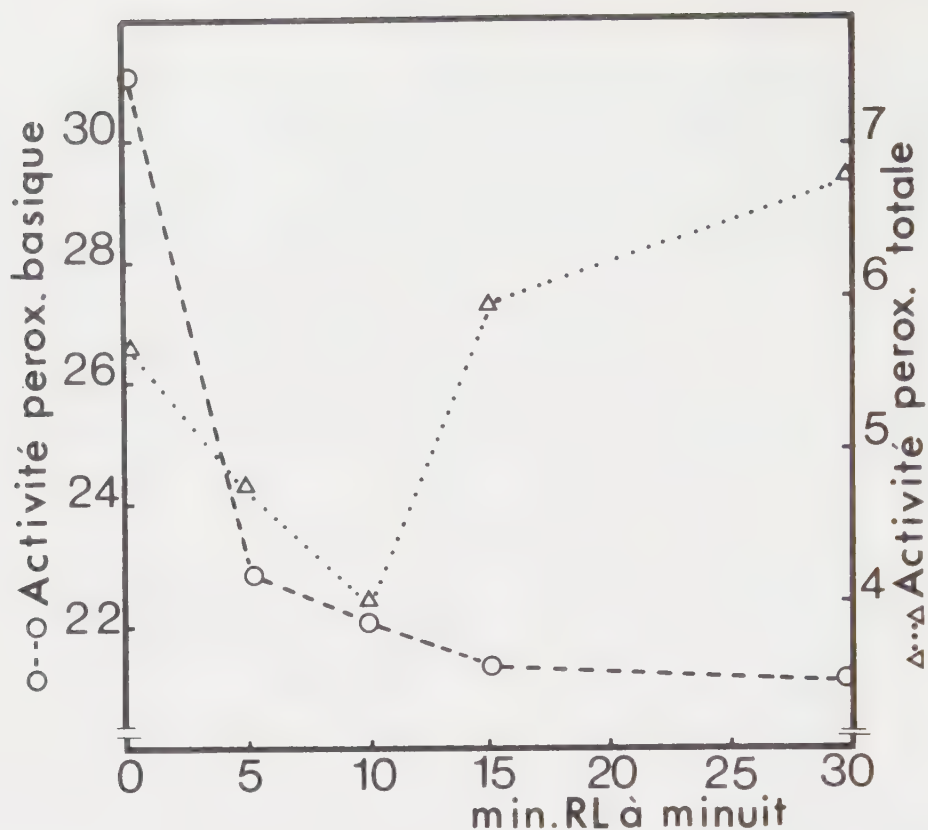


Fig. 61. Effet d'éclairs de RL de différentes durées donnés pendant la photopériode inductrice (à minuit) sur l'activité des peroxydases basiques et totales ($A_{470}/\text{mg prot}$), mesurées après 24 h de lumière.

VIII. 4. ROLE DE LA PHOTOSYNTHESE LORS DU TRANSFERT EN LUMIERE CONTINUE

Une des premières conséquences du transfert de plantes cultivées en jours courts en lumière continue est évidemment la prolongation de la photosynthèse et l'accumulation de ses produits et de l'énergie. La sensibilité photopériodique est particulièrement dépendante de la photosynthèse chez les plantes de jours longs. La suppression du CO_2 de l'atmosphère ou l'application de DCMU, inhibiteur du transport électronique, défavorisent l'induction florale chez celles-ci (Bavrina et al., 1969). Le fait que le saccharose permet de lever cette inhibition indique que la photosynthèse agit peut-être par l'entremise des molécules riches en énergie qu'elle produit. Cependant, elle entretient des liens directs avec le phytochrome, soit dans les processus à haute énergie (Schneider et Stimson, 1972), soit dans

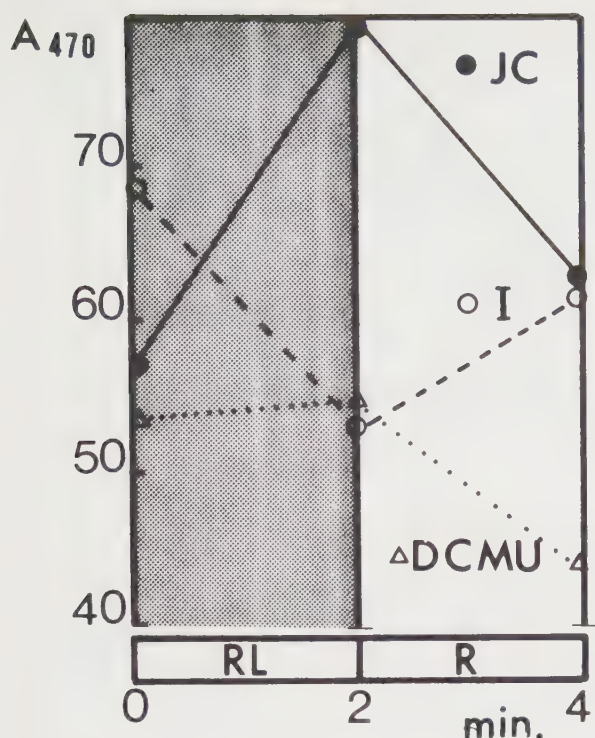


Fig. 62. Effet de la séquence RL-R sur l'activité des peroxydases basiques chez *Spinacia* au début du 35^e JC et après 24 h de lumière (I), ain-JC (Te) et 15 min après un traitement si que chez des plantes traitées au DCMU (10^{-4} M) au début de la photopériode supplémentaire. RL et R: $70 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ (expérience répétée 3 fois).

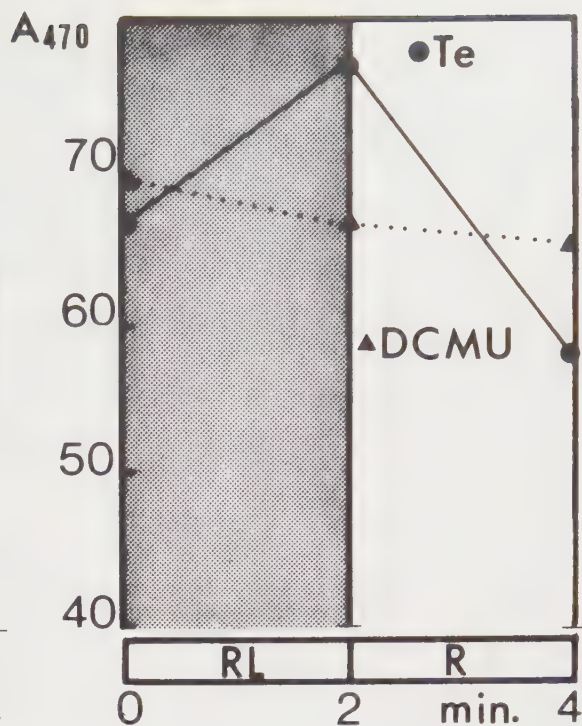


Fig. 63. Effet de la séquence RL-R sur l'activité des peroxydases basiques chez *Spinacia* au début du 30^e JC (Te) et 15 min après un traitement au DCMU (10^{-4} M). RL et R: $70 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ (expérience répétée 3 fois).

la réponse du phytochrome à la photopériode (Greppin et al., 1973). On ne peut donc exclure que sa participation à l'induction florale provienne d'une interaction avec le phytochrome. L'importance de celui-ci est démontrée par le fait qu'une interruption de quelques minutes d'une période prolongée d'obscurité avec de la lumière rouge supprime l'effet inhibiteur de celle-ci sur la floraison des plantes de jours longs (Borthwick et al., 1948). Dans ce cas, la photosynthèse ne peut intervenir.

Résultats

La réaction des peroxydases basiques à un éclair de RL est inversée, chez des plantes cultivées en jours courts, par 24 heures de lumière

continue. Ce résultat est obtenu en remplaçant les 16 heures d'obscurité du cycle jour court-nuit longue par 16 heures de lumière. L'administration de DCMU au début de ces 16 heures de lumière supprime leur effet sur les peroxydases basiques, tant en ce qui concerne leur augmentation d'activité, qu'en ce qui concerne leur réponse à un éclair de RL (fig. 62). Comme le DCMU est vaporisé sur les plantes 16 heures avant le dosage des peroxydases, on peut supposer que son effet direct a cessé de se faire sentir.

Le DCMU n'agit pas seulement sur la photosynthèse et l'induction photopériodique. Il perturbe aussi la réponse des peroxydases basiques à un éclair de RL. Dans la figure 63, l'inhibiteur est vaporisé sur les plantes 15 minutes avant qu'elles ne reçoivent 2 minutes de RL et 2 minutes de R. On voit que les plantes traitées ne réagissent pratiquement pas à la photostimulation.

Les résultats présentés dans ce paragraphe semblent indiquer une participation de la photosynthèse à la mise en place de "l'état induit des peroxydases", comme de l'induction florale. La photosynthèse pourrait également intervenir dans la relation phytochrome-peroxydases.

VIII. 5. EFFET DE L'ACETYLCHOLINE SUR LES PEROXYDASES BASIQUES

On sait depuis quelques années (Jaffe, 1970) que l'acétylcholine est présente chez les plantes où elle joue vraisemblablement un rôle physiologique actif (Jaffe, 1972). Certains éléments indiquent qu'elle pourrait être le médiateur entre le phytochrome et des récepteurs de nature inconnue. Les plantes possèdent un système enzymatique pour la dégrader (Riov et Jaffe, 1971). Son application à une plante provoque les mêmes effets que la lumière rouge (Yunghans et Jaffe, 1972).

En jours courts, chez l'Epinard, elle permet d'obtenir les premiers signes de l'évocation florale de l'apex (nombre de mitoses, hauteur de l'apex: Auderset, 1974) et certains effets de l'induction photopériodique

sur les chloroplastes de feuilles (Bonzon, 1974). Mais elle provoque une inhibition de floraison chez une autre plante de jours longs, *Lemna gibba*, lorsqu'elle est appliquée en lumière continue (Kandeler, 1972).

Comme les peroxydases basiques réagissent rapidement aux lumières rouge et rouge lointain, il est intéressant de savoir si elles sont sensibles également à l'acétylcholine.

Résultats

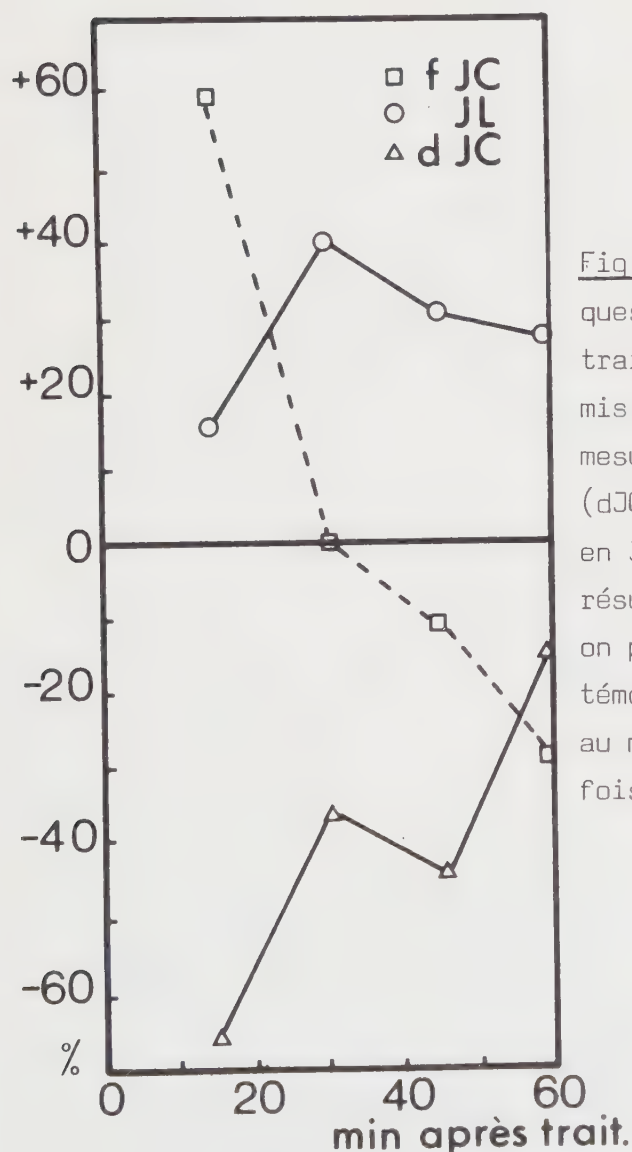


Fig. 64. Evolution des peroxydases basiques chez *Spinacia* de 30 JC et de 18 JL traité à l'acétylcholine (10^{-4} M) puis mis à l'obscurité. Le traitement et les mesures sont effectués au début du JC (dJC), à la même heure pour les plantes en JL (JL) et à la fin du JC (fJC). Les résultats sont exprimés en % de variation par rapport à l'activité de plantes témoins mises à l'obscurité et prélevées au même moment (expérience répétée 3 fois).

Des plantes cultivées en jours courts sont traitées à l'acétylcholine au début et à la fin de la photopériode, puis mises à l'obscurité. Des plantes cultivées en jours longs sont traitées à 8 heures le matin et mises également à l'obscurité. L'activité des peroxydases basiques est me-

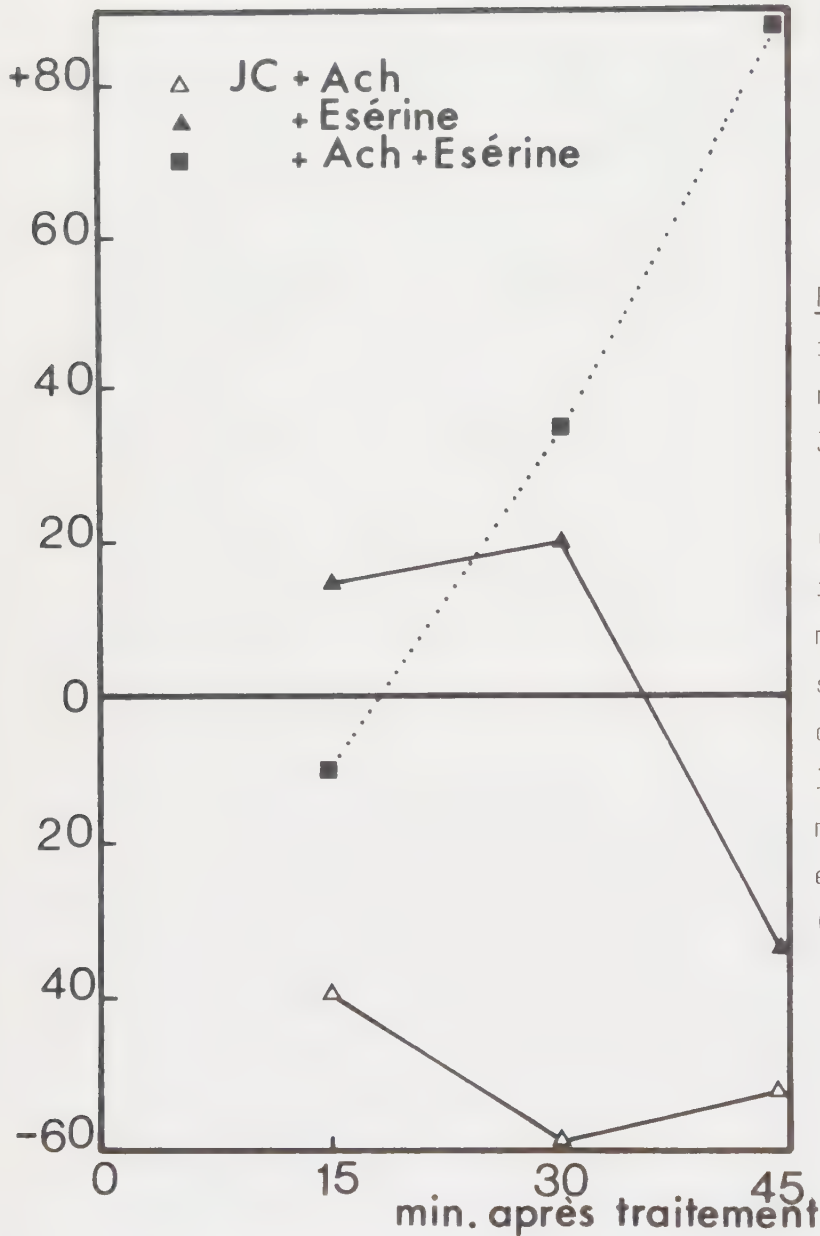


Fig. 65. Evolution des peroxydases basiques chez *Spinacia* traitée au début du 30^e JC avec de l'acétylcholine (Ach. 10^{-4} M), de l'ésérine (10^{-3} M) et de l'Ach suivie immédiatement d'ésérine et mis à l'obscurité. Les résultats sont exprimés en % de variation par rapport à l'activité de plantes témoins mises à l'obscurité et prélevées en même temps (expérience répétée 2 fois).

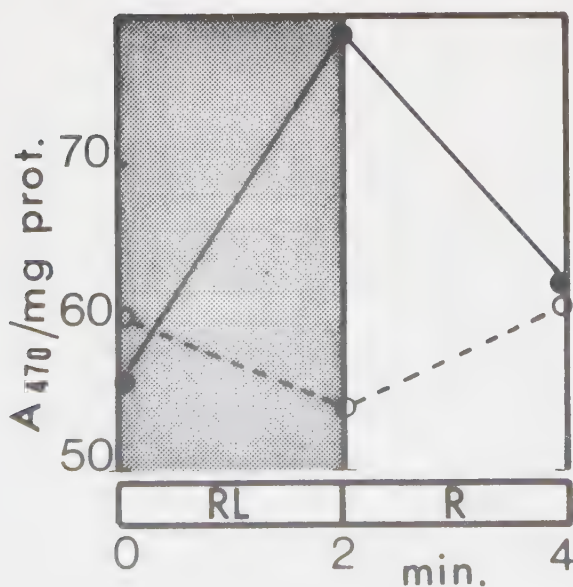


Fig. 66. Effet de la séquence RL-R sur l'activité des peroxydases basiques de *Spinacia* au début du 34^e JC et au même moment chez des plantes identiques ayant reçu de l'acétylcholine (Ach. 10^{-4} M) à la fin des 2 JC précédents. RL et R: $70 \mu\text{W}/\text{cm}^2$. Cette expérience a été répétée 2 fois.

surée 15, 30, 45 et 60 minutes après le traitement et comparée à celle de plantes témoins simplement mises à l'obscurité. La figure 64 montre que les plantes en jours courts et en jours longs réagissent de façon opposée. Les premières, au début du jour court, répondent par une augmentation d'activité, les secondes par une diminution. L'effet se maintient pendant une heure au moins. Lorsque les plantes sont traitées à la fin de la photopériode courte, elles présentent d'abord une réponse analogue à celle de plantes cultivées en jours longs, puis leur activité diminue rapidement. Il est important de remarquer qu l'acétylcholine produit le même effet que la lumière rouge, tel qu'il a été présenté à la figure 53. Le rapprochement de ces deux résultats indiquerait bien que les peroxydases basiques sont contrôlées par le phytochrome de la même façon que certains processus physiologiques telle que la respiration.

L'ésérine (ou physostigmine) est un inhibiteur de l'acétylcholine estérase. Son application à des Epinards au début du jour court provoque une réaction complexe des peroxydases basiques, d'abord inverse de celle produite par l'acétylcholine, puis semblable (figure 45). Associée à celle-ci, elle inverse son action. Ces résultats doivent être examinés en tenant compte du fait que l'activité peroxydasique peut osciller. Cette oscillation est peut-être tributaire de la concentration en acétylcholine, comme elle l'est de la dose de rouge lointain. L'addition d'ésérine aurait pour résultat d'augmenter la concentration endogène en acétylcholine, avec pour conséquence une réponse différente des peroxydases.

L'acétylcholine donnée à des plantes au début de deux nuits longues consécutives provoque, à la fin de la deuxième nuit, la transformation de la sensibilité des peroxydases basiques aux lumières rouge et rouge lointain. Cette transformation est qualitativement semblable à celle que produisent 24 heures de lumière continue (fig. 66). Elle provoque en plus une élévation d'activité, comme l'induction photopériodique. Cette substance permet donc à la fois l'apparition de l'évocation florale dans le méristème et celle de "l'état induit des peroxydases".

VIII. 6. DISCUSSION

Il n'y a pour l'instant que peu de travaux concernant l'influence in vivo de la longueur d'onde de la lumière sur l'activité des peroxydases. Les résultats présentés dans ce chapitre donnent une idée de la complexité des réponses de ces enzymes à la lumière. Elles sont fortement dépendantes de la composition spectrale de celle-ci. D'autre part, le pH d'extraction utilisé (7 ou 10,5) joue un rôle très important dans la mise en évidence de leur réponse aux conditions d'éclairement.

La culture d'Epinards en lumière rouge ou bleue permet de dégager quelques enseignements:

a) en jours courts, la lumière provoque une diminution des activités (ou l'obscurité une augmentation), sauf au moment de l'induction photopériodique;

b) dans cette inhibition, les lumières rouge et bleue sont plus efficaces que la lumière blanche, la première l'étant plus que la seconde;

c) l'action inhibitrice de la lumière s'exerce sur les enzymes basiques, les enzymes acides, elles, sont favorisées. Les AIA-oxydases suivent la même évolution que les peroxydases, mais leur variation d'activité en fonction de la lumière a souvent été attribuée à des effecteurs phénoliques (Watanabe et Stutz, 1960; Sagi et Garay, 1961; Engelsma et Meijer, 1965). Les enzymes acides et basiques ne réagissent pas de la même manière. Cela indique que les deux groupes obéissent à des systèmes de contrôle différents, ce qui rejoint les conclusions que l'on pouvait tirer au sujet de l'induction photopériodique étudiée par électrofocalisation (rapport a/b).

Schopfer et ses collaborateurs sont pour l'instant les seuls à avoir mis en évidence une relation physiologique entre le phytochrome et les peroxydases. Rappelons qu'elle concerne la biosynthèse de ces enzymes

dans les plantules étiolées de Sinapis. Dans les feuilles d'Epinard, nous avons montré deux types de relation. La première a des effets assez durables (fig. 51) et pourrait être le résultat d'une néosynthèse d'enzyme. Cependant, la preuve n'en a pas été apportée. La seconde concerne la réaction immédiate des peroxydases basiques aux modifications d'état du phytochrome. Un tel type de relation a été montré pour d'autres enzymes, mais non pour les peroxydases. Il peut être résumé de la façon suivante:

- a) à la suite d'un éclair rouge lointain, l'activité des peroxydases basiques subit des oscillations rapides;
- b) après un éclair RL d'énergie variable, la variation d'activité mesurée à un temps déterminé oscille également en fonction de l'énergie;
- c) la quantité de P_{fr} pourrait déterminer l'ampleur de la phase initiale de diminution d'activité (voir chapitre X);
- d) la réponse des peroxydases basiques est aussi déterminée par l'état physiologique des feuilles (induites ou non induites).

La différence de réponse des peroxydases à la lumière RL qui est observée entre les plantes induites et non induites est très importante. Elle peut conduire à une explication de l'induction florale, même si les peroxydases ne sont pas liées à celles-ci. Cette impression est confirmée par l'irréversibilité partielle de la transformation du contrôle des peroxydases lors du transfert en conditions inductrices (tableau X).

Cela constitue un argument de plus en faveur d'un "état induit des peroxydases" déjà mis en évidence lors de l'induction mimée (tableau VI). Le rapport peroxydases acides/peroxydases basiques subit une évolution caractéristique lors du passage de plantes cultivées en jours courts en lumière continue. Cette évolution ne se produit pas lors du transfert de plantes induites. Comme les peroxydases acides semblent s'adapter chaque fois à un changement de photopériode (fig. 41 et 42), il est probable que la modification définitive produite par le transfert affecte, dans ce cas également, le groupe des isoperoxydases basiques.

L'inhibition de l'augmentation des peroxydases basiques lors de l'induction photopériodique par un éclair de RL de faible durée ne correspond pas à ce que l'on sait du rôle du phytochrome dans la floraison des plantes de jours longs. Celle-ci est généralement favorisée par l'administration de faibles doses de RL, ce qui peut paraître paradoxal (Vince, 1972). Chez l'Epinard, le développement floral de l'apex après 6 jours de lumière continue est nettement plus avancée chez des plantes qui ont reçu 10 minutes de RL ($50 \mu\text{W}/\text{cm}^2$) toutes les 12 heures (à minuit et à midi) que chez les plantes témoins (Auderset, 1974). Il semblerait donc que, de ce point de vue, peroxydases basiques et floraison aient des comportements opposés. Il faut cependant prendre en considération le fait que l'impact de l'éclair de RL sur les peroxydases a été mesuré sur une seule période de 24 heures de lumière. Ce sont les tous premiers événements de l'induction qui sont affectés dans ce cas. Il n'est pas impossible -ce sera à vérifier- que les premières manifestations au niveau de l'apex (remaniements des plastes, etc.) soient bloquées elles-aussi par le RL. Au contraire, après plusieurs jours de lumière continue entrecoupée de brefs éclairs de RL, ces premières manifestations, de même que l'organogénèse florale, ont toutes les chances de se produire, les 12 heures séparant les périodes de RL correspondant à peu près à la photopériode critique de l'Epinard. Dans ce cas, la floraison peut être favorisée par le RL, parce que P_{fr} lui est défavorable à certains moments (Vince, 1965), ou parce que le RL protège de la destruction une certaine fraction du phytochrome plus particulièrement impliquée dans son initiation. Il faut cependant noter que, selon Greppin et al. (1973), l'administration de RL pendant l'induction photopériodique bloque bien la formation de P_{fr} . Toutefois, dans ce travail, les conditions expérimentales sont différentes. Durant les 72 heures d'induction, les épinards reçoivent une heure de RL (rapport des énergies 730 nm/660 nm: 3) 2 fois par 24 heures (à 8 heures et à 16 heures).

VIII. 7. RESUME

La durée et la qualité de la lumière influencent l'activité des peroxydases, particulièrement l'activité des peroxydases basiques. La lumière rouge lointain (730 nm) et rouge (660 nm) modifient cette dernière activité de façon très rapide et opposée. La réponse des peroxydases basiques à 2 minutes de RL dépend de l'état du phytochrome (moment du cycle jour/nuit) et de l'état de la plante (induite ou non). L'induction photopériodique modifie cette réponse de façon semble-t-il irréversible. Le DCMU ou un bref éclair de RL annule l'effet d'une induction de 24 heures de lumière. L'acétylcholine, au contraire, est capable de le reproduire sur des plantes restées en jours courts.

IX. MODIFICATIONS DES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES PEROXYDASES BASIQUES

Le traitement subi par un extrait a une grande importance sur les propriétés physico-chimiques des peroxydases qu s'y trouvent. La force ionique du tampon utilisé, son pH, la température de l'extrait sont des éléments déterminants. Janssen (1970a et 1970b) a montré que les peroxydases et les auxine-oxydases de Pois se fragmentaient en unités de poids moléculaire plus petit, mais toujours fonctionnelles, lorsque l'extrait est conservé à 22° C. D'autre part, des peroxydases liées aux membranes peuvent présenter des propriétés électrophorétiques extrêmement différentes selon qu'elles ont entraîné ou non des fragments de membranes (van der Mast, 1970b). Il existe dans la plante une quantité de molécules capables de modifier l'activité des peroxydases (Pickering et al., 1973). Beaucoup d'entre elles sont des phénols qui se fixent sur les protéines par liaison hydrogène ou par covalence lorsqu'elles sont oxydées en quinones. Cette fixation s'accompagne d'une modification du poids moléculaire des protéines et de leur vitesse de migration lors d'une électrophorèse (Fieldes et Tyson, 1973). En conséquence, on peut imaginer que lorsque des peroxydases sont extraites, certains effecteurs restent solidement liés à elles et continuent à affecter leur activité même après séparation par électrophorèse.

Bien que Janssen ait montré qu'elles pouvaient se décomposer en sous-unités fonctionnelles, les peroxydases ne sont pas considérées comme étant des oligomères. Elles ne possèdent qu'un atome de fer par molécule de protéine (Harper, 1965). Shih et al. (1971), travaillant sur la peroxydase de Raifort, n'ont pas pu mettre en évidence de sous-unités. On peut cependant remarquer que de nombreuses auxine-oxydases présentent une ciné-

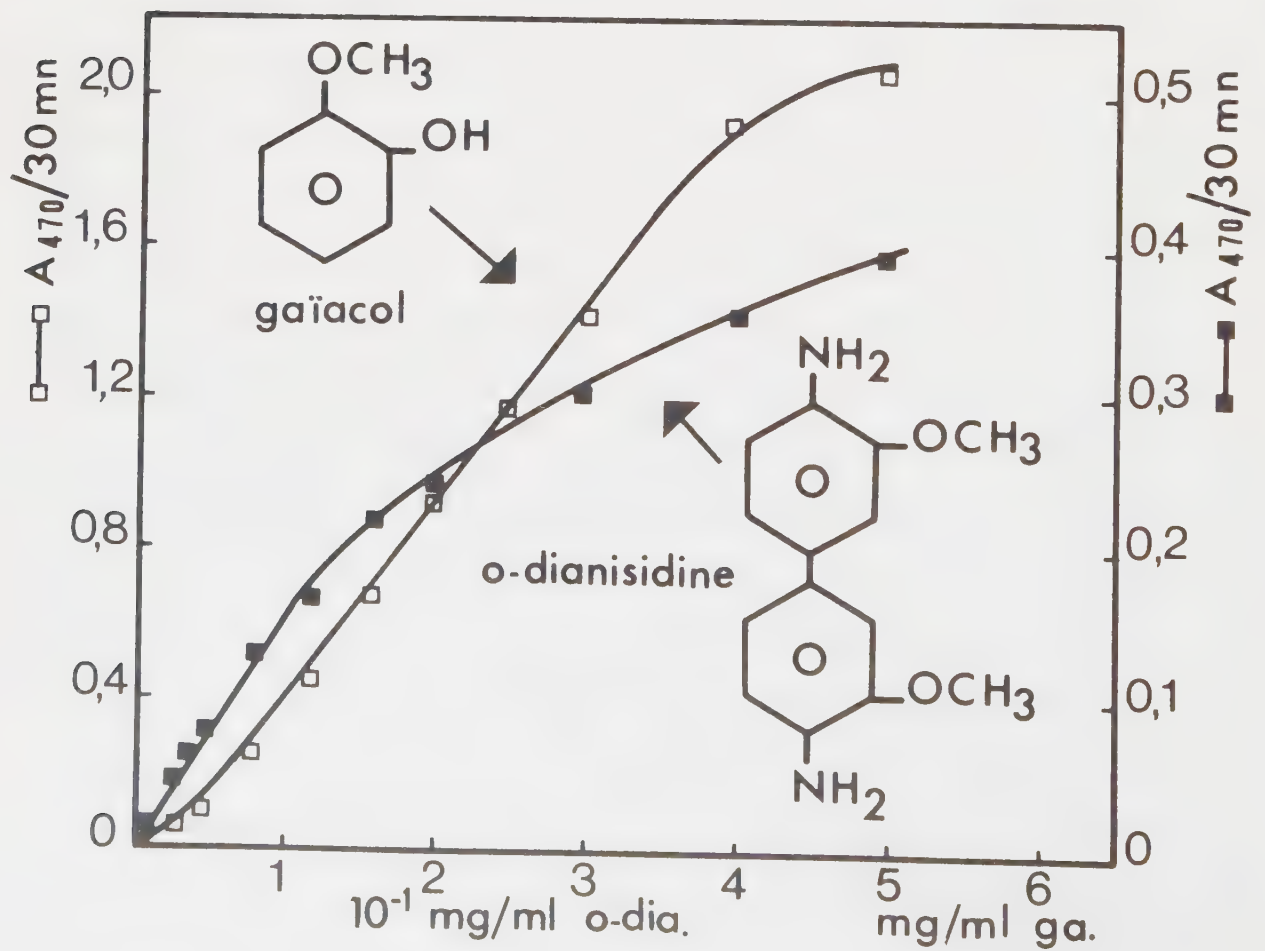
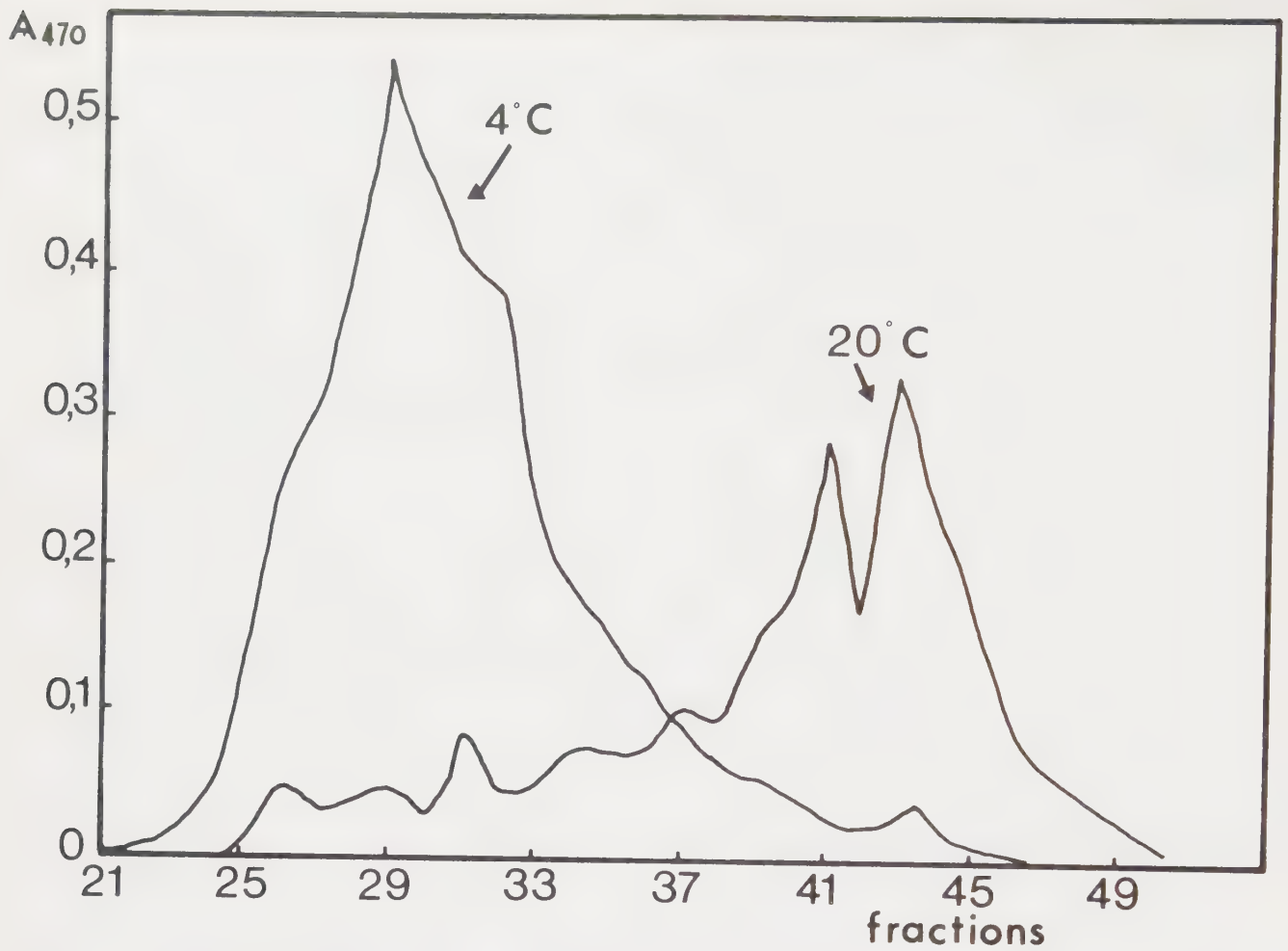
tique de type allostérique (ou coopératif). C'est le cas notamment de celles d'Erable (Lescure, 1970) et de Chou (Raa, 1971). Dans le premier cas, l'urée supprime cet effet. On sait que des enzymes qui présentent une cinétique de ce type sont généralement composées de sous-unités identiques ou non (Atkinson, 1966; Koshland, 1968) dissociables par l'urée. Une sous-unité isolée présente une cinétique ($v = f(s)$) hyperbolique alors que le polymère présente une cinétique sigmoïdale (Changeux et Gerhart, 1967).

Un exemple de polymérisation des peroxydases est fourni par Pandey (1967) qui avance des indications électrophorétiques et génétiques. Il ne faut pas oublier d'autre part que les peroxydases peuvent s'unir pour former des catalases (Goldfisher et Essner, 1970).

Résultats et discussion

Nous avons vu que l'électrofocalisation de peroxydases basiques extraites à pH élevé ne révèle la présence que d'un seul pic à pH 8,5 (fig. 16) alors que celle d'un extrait préparé à pH 7 présente au moins 4 pics basiques (8,5; 9,5; 10,2; 11,0). On pourrait en déduire que les peroxydases basiques sont formées à partir d'une seule unité de pH 8,5. Lorsque l'extrait est préparé à 20° C au lieu de 4° C ou si la préparation de peroxydases basiques est conservée à 20° C pendant 15 minutes, le volume d'élution de ces peroxydases dans une colonne de Sephadex G100 est considérablement augmenté (fig. 67). La présence de NaCl 0,4 M empêchant toute fixation des protéines sur la résine, on peut en conclure que les peroxydases basiques d'Epinaud peuvent se scinder en sous-unités fonctionnelles.

La réaction des peroxydases basiques avec des concentrations croissantes de substrat permet d'obtenir des courbes dont l'allure peut être très différente selon la nature du donneur d'électrons. C'est le cas avec l'o-dianisidine et le gaïacol (fig. 68) qui donnent respectivement une hyperbole et une sigmoïde. Comme la préparation enzymatique est identique



on peut imaginer que les interactions entre le substrat et l'enzyme ne sont pas les mêmes dans les deux cas. La différence pourrait être due à la taille des molécules, celle d'o-dianisidine étant plus volumineuse que celle de gaïacol. L'allure de la courbe obtenue avec le gaïacol laisse entrevoir la possibilité que ce dernier exerce sur les peroxydases basiques un effet coopératif, la première molécule qui se fixe sur l'enzyme facilitant la fixation des suivantes (pour autant que la molécule d'enzyme comporte plusieurs sites actifs).

La forme de la courbe $A_{470} = f(\text{gaïacol})$ est modifiée par l'adjonction de phénols que l'on trouve à l'état naturel chez les plantes, comme la rutine et les acides p-coumarique, férulique et chlorogénique. Ces cofacteurs ajoutés en petites concentrations ($2 \cdot 10^{-6}$ M) par rapport au gaïacol ($3,2 \cdot 10^{-4}$ à $2,4 \cdot 10^{-2}$ M) agissent de façon spectaculaire sur la cinétique de peroxydation du gaïacol par une quantité constante d'enzyme (fig. 69). Les acides p-coumarique et férulique, qui sont connus pour accroître l'activité des peroxydases et des auxine-oxydases (Pickering et al., 1973), favorisent une cinétique de type hyperbolique. L'acide chlorogénique et la rutine, qui diminuent ces activités, une cinétique de type sigmoïdal. L'action de ces effecteurs se répercute sur l'accroissement de la concentration de gaïacol nécessaire pour que la vitesse de réaction passe de 10 à 90 % de la vitesse maximum (tableau XI). En fait, la rutine et l'acide chlorogénique, qui sont considérés comme des inhibiteurs des peroxydases, augmentent la sensibilité de celles-ci vis-à-vis du changement de concentration du gaïacol. Avec la rutine, la vitesse de réaction passe de 10 à 90 lorsque la concentration augmente de 4 fois environ, alors que pour le témoin, il faut que cette concentration augmente de plus de 7 fois, et de

Fig. 67 (haut). Comparaison des volumes d'élution de peroxydases basiques préparées à 4° et 20° C à partir de *Spinacia*. Séparation sur colonne de Sephadex G100 (1,2X50 cm). L'activité est dosée dans chaque fraction.

Fig. 68 (bas). Vitesses d'oxydation du gaïacol et de l'o-dianisidine (A_{470} /30 min) en fonction de leur concentration par une quantité constante de peroxydases basiques de *Spinacia*.

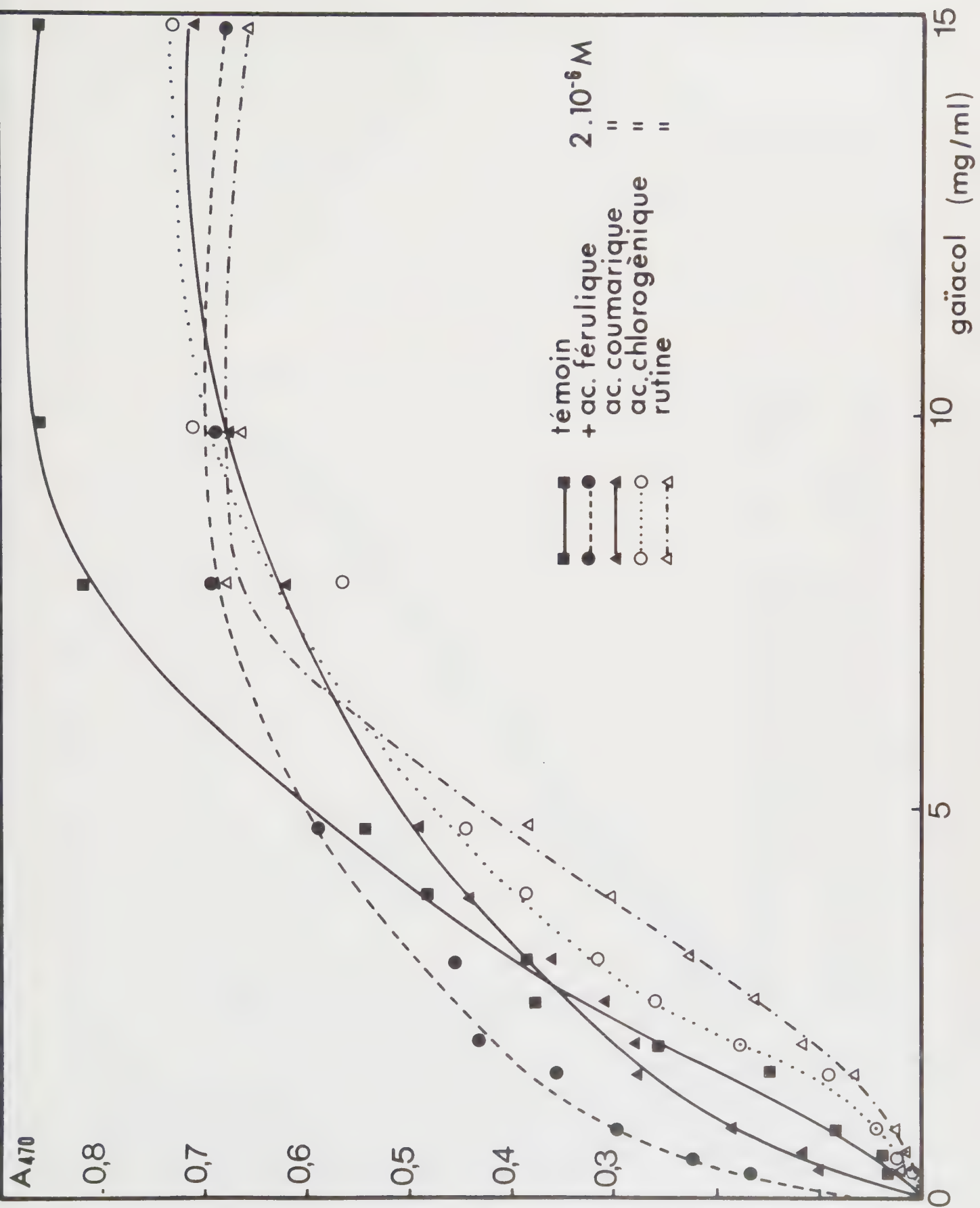
40 fois en présence d'acide férulique. Les effecteurs phénoliques agissent donc comme régulateurs peroxydasiques. Il reste à déterminer leur rôle exact. Agissent-ils vraiment sur le degré d'association d'éventuelles sous-unités peroxydasiques, leur conférant de ce fait une cinétique plus ou moins coopérative, ou d'une autre façon?

TABLEAU XI. ACCROISSEMENT DE LA CONCENTRATION DE GAIACOL NECESSAIRE POUR QUE SA VITESSE D'OXYDATION PAR LES PEROXYDASES BASIQUES PASSE DE 10 à 90 % EN PRESENCE DE CERTAINS EFFECTEURS (MESURES SUR LES CINETIQUES DE LA FIGURE 69).

	Accroissement de la concentration de gaïacol
Témoin	7,4
+ ac. p-coumarique $2 \cdot 10^{-6}$ M	40,0
+ ac. férulique "	42,2
+ ac. chlorogénique "	7,2
+ rutine "	4,1

On peut constater en tous cas des différences cinétiques entre diverses préparations de peroxydases basiques provenant de plantes ayant reçu des traitements lumineux différents. La figure 70 montre des cinétiques mesurées au début du jour court sur des peroxydases de plantes ayant reçu ou non un éclair de RL et sur les peroxydases de plantes ayant reçu 24 heures de lumière. Les différences qui apparaissent pourraient être dues à la présence de polyphénols différents suivant la lumière reçue par la plante. Si cette hypothèse est exacte, la lumière pourrait contrôler les peroxydases basiques par l'intermédiaire des polyphénols. Notons que quelques ré-

Fig. 69. Vitesses d'oxydation du gaïacol ($A_{470}/30$ min) en fonction de sa concentration par des quantités constantes d'une même préparation de peroxydases basiques de Spinacia, en présence de certains polyphénols.



sultats préliminaires semblent indiquer que le traitement lumineux subi par la plante, de même que l'adjonction de phénols à la préparation de peroxydases basiques, modifieraient le profil d'élution des peroxydases sur une colonne de Sephadex G100. Cela signifierait que sous l'action des conditions extérieures, et par l'entremise des phénols, les peroxydases seraient susceptibles de modifications de leur structure moléculaire en même temps que de leurs propriétés cinétiques. L'étude de cette possibilité, qui doit être poursuivie, présente des difficultés expérimentales.

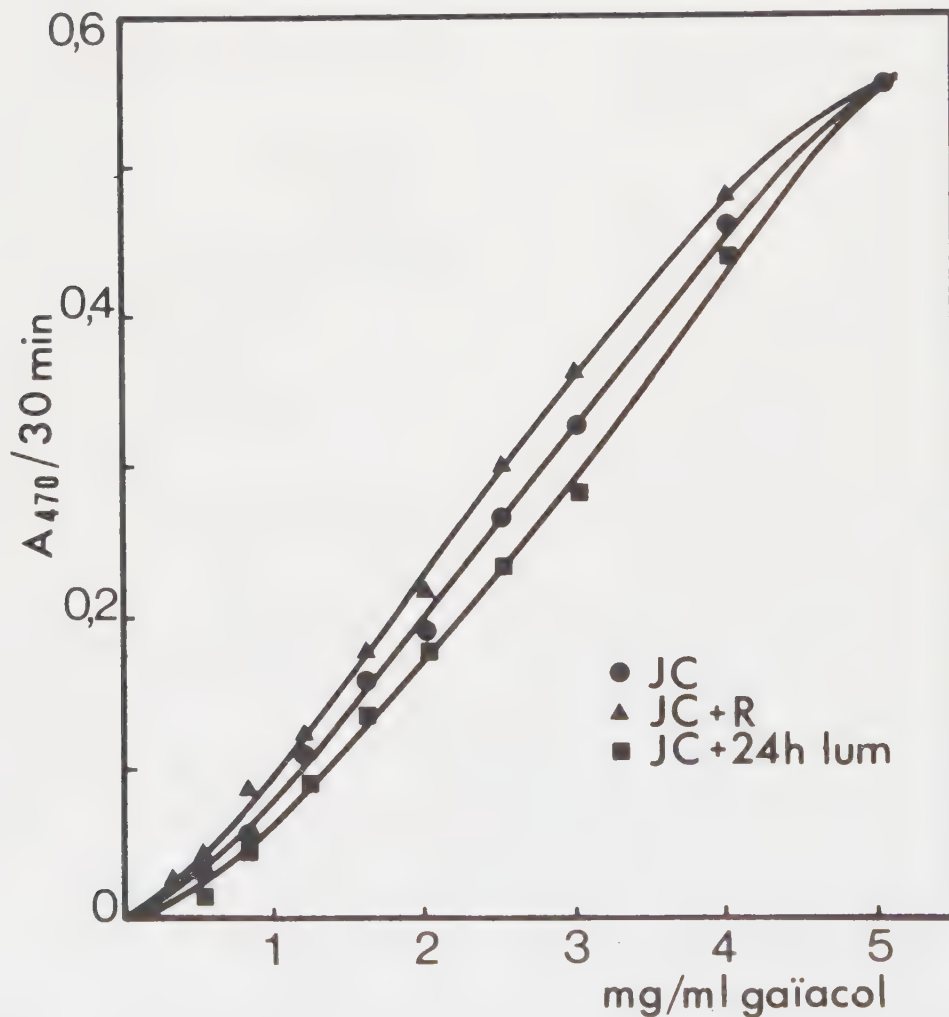


Fig. 70. Vitesses d'oxydation du gaïacol ($A_{470}/30 \text{ min}$) en fonction de sa concentration par des peroxydases basiques provenant de *Spinacia* ayant subi des traitements lumineux différents.

X. DISCUSSION GENERALE

X. 1. LES ACTIVITES PEROXYDASIQUES TOTALES ET BASIQUES

Les peroxydases présentent une évolution caractéristique chez les Epinards cultivés en jours courts et en jours longs. Dans les deux cas, elles passent par un minimum d'activité au stades 4 feuilles. Ce minimum coïncide avec l'acquisition de l'aptitude endogène des plantes à fleurir. L'évolution des peroxydases peut être rapprochée de celle des auxines. Un des rôles principalement attribués à ces enzymes est en effet le catabolisme auxinique. Chez une plante de jours longs, *Hyoscyamus niger*, les auxines endogènes, abondantes dans les plantes jeunes, diminuent et atteignent un minimum au moment de la formation des boutons floraux. Leur taux subit alors une augmentation transitoire, puis il y a une nouvelle augmentation pendant la floraison proprement dite (Gilson, 1957). Dans de nombreux cas, la floraison intervient au moment où les feuilles d'une plante sont le plus pauvre en auxines libres (Cooke, 1954; Moore et Hough, 1962). Cependant, chez l'Epinard, Konishi (1956) n'a pas pu mettre en évidence de différence de taux auxinique entre les plantes induites et non induites. Il existe en revanche une capacité auxine-oxydasique différente entre les deux types de plantes, aussi bien in vivo qu'in vitro, qui semble due à la présence d'effets différents.

Dans les tissus étiolés, il est généralement admis qu'il y a une relation inverse entre le taux en auxines libres et celui en peroxydases ou auxine-oxydases (Pilet et Nougarede, 1965; Galston, 1967). Cette rela-

tion est plus complexe dans les tissus contenant de la chlorophylle (Pilet et Phipps, 1968). La quantité de polyphénols présente dans les tissus est en effet dépendante de l'activité photosynthétique. Selon Galston, le système auxine-oxydasique serait un mécanisme de régulation de la croissance. Les tissus à faible croissance seraient riches en peroxydases et pauvres en auxines. Il est un fait que les tissus en dormance, par exemple, sont riches en certaines peroxydases (Gaspar et al., 1973), mais un haut niveau peroxydasique peut aussi indiquer une faculté plus grande à lever la dormance (Poovaiah et al., 1972). La relation entre ces enzymes et la croissance n'est sans doute pas aussi simple, car l'activité peroxydasique est généralement répartie dans plusieurs fractions moléculaires différentes, dont la sensibilité aux auxines et le comportement en fonction du taux de croissance peuvent être opposés (Stuber et Levings, 1969; Birecka et al., 1973). Nous avons déjà rappelé l'antagonisme qui existe entre les auxine-oxydases très anioniques et peu anioniques de cals de Tabac vis-à-vis de l'auxine exogène et de la croissance (Lee, 1971b et 1972).

La relation auxine-peroxydases est donc complexe. Lorsqu'on l'étudie, il faut tenir compte également de l'intervention d'effecteurs positifs ou négatifs des enzymes (Janssen, 1970b). Ces effecteurs présents dans la feuille et extraits en même temps que les peroxydases peuvent modifier l'activité et les caractéristiques migratoires de celles-ci (Fieldes et Tyson, 1973). D'autre part, suivant le rapport quantitatif entre l'effecteur et l'enzyme, l'effecteur (par exemple les acides cafféiques et chlorogénique) pourra être négatif ou positif (Imbert et Wilson, 1972). Enfin, rien n'indique que les effecteurs auxine-oxydasiques et les peroxydases se situent toujours dans les mêmes compartiments cellulaires. Ils peuvent n'être mis en contact que lors de l'extraction. Il faut cependant signaler que l'application à des tissus d'activateurs ou d'inhibiteurs de la fonction auxine-oxydasique des peroxydases permet de modifier leur croissance (Pilet et Mato, 1967).

L'Epinard en jours longs présente un minimum d'activité peroxydasique au moment où la tige se développe (montaison). Cette croissance demande certainement l'apport accru d'auxines. Dans les plantes cultivées en jours courts, la même évolution est observée, quoique de façon atténuée. Elle s'accompagne aussi parfois d'une légère élongation de l'axe. Il peut donc y avoir une certaine corrélation entre les peroxydases, les auxines et la croissance. Mais il faut tenir compte du fait que l'activité peroxydasique est mesurée dans les feuilles. On ne sait pas quelle est la situation dans la tige.

Les peroxydases basiques, dont l'activité est dans de nombreux cas inversement proportionnelle à la croissance, subissent une évolution similaire à celle des peroxydases totales. On peut supposer que ce sont elles qui sont en fait responsables d'une bonne partie des variations mesurées des peroxydases totales, comme c'est le cas chez une Orchidée (Alvarez et King, 1969). Toutefois, les minima pour les deux groupes d'enzymes (totales et basiques) ne correspondent pas tout à fait.

Il est intéressant de constater que le minimum de l'activité peroxydasique totale correspond à un stade de développement (temps interne) et non à un âge (temps externe). Les peroxydases entament leur phase d'augmentation d'activité au stade 4 feuilles (environ 17 JL ou 30 JC). Cette évolution enzymatique pourrait être déterminée par un événement important dans la morphogénèse de la plante ou dans une modification des relations physiologiques qui existent entre les divers organes de celle-ci. Cet événement pourrait être la fin de la croissance de l'hypocotyle, la sénescence des cotylédons (fin de l'hétérotrophie) ou la modification du fonctionnement du méristème apical qui cesse d'être purement végétatif (Auderset, 1974). Lorsque la plante présente 4 feuilles visibles, l'apex en a formé une dizaine, aussi bien en jours longs qu'en jours courts. La nature de l'influence qu'il exerce sur les autres parties de la plante serait alors changée, l'Epinard étant apte à fleurir. On sait en effet

que beaucoup de plantes ne fleurissent que lorsqu'elles ont formé un certain nombre de feuilles. Cela expliquerait pourquoi l'activité peroxydasique subit la même évolution en jours courts et en jours longs. Dans le premier cas, le minimum d'activité correspond à l'instauration dans l'apex d'un état intermédiaire mi-végétatif/mi-floral (Nougarède, 1965) qui évoluera lentement vers la formation de bourgeons floraux. Dans le second, il correspond à l'installation définitive du fonctionnement floral. Ce qui distingue les deux situations du point de vue des peroxydases, c'est le niveau de leur activité (totale et basique), plus fort en jours courts qu'en jours longs, ainsi que l'amplitude des variations entre le maximum et le minimum d'activité.

Des corrélations entre le développement d'une plante et le niveau d'activité peroxydasique ont déjà été mises en évidence dans d'autres plantes, dont l'Orge par exemple (Gupta et Stebbins, 1969). Dans le méristème de cette plante, l'activité des peroxydases augmente jusqu'au stade 3 feuilles, puis diminue. Le maximum d'activité correspond au moment où la plante passe de l'état végétatif à l'état floral (plante de jours longs). Il s'agit là d'une évolution inverse à celle observée chez l'Epinard, mais dans le méristème. Dans les feuilles, la diminution est constante. Chez Coleus, chaque organe (racine, tige, feuille) présente également une évolution distincte au cours de la vie de la plante (Kaminski, 1971).

La différenciation sexuelle des plantes dioïques est liée à des facteurs hormonaux. Les auxines, notamment, sont plus abondantes chez les plantes femelles (Galun et al., 1965). Il est même possible de féminiser certaines plantes par traitement auxinique (Laibach et Kribben, 1950). Quelques essais effectués dans notre laboratoire ont montré que l'Epinard pouvait également réagir de cette façon. Il n'est donc pas étonnant que le contenu en peroxydases des plantes mâles et femelles ne soit pas le même. Cela a déjà été relevé chez le Concombre, dont les plantes femelles possèdent des activités peroxydasiques et auxine-oxydasique plus élevées que les

mâles. Chez l'Épinard, c'est le contraire, bien que, au début de la floraison, les femelles aient une activité plus forte que les mâles. On peut rappeler que la culture en lumière bleue masculinise les plantes et que la lumière rouge féminise (Greppin, 1965). Or cette dernière inhibe les activités AIA-oxydasique et peroxydasique d'avantage que la lumière bleue, épargnant de ce fait l'auxine endogène, facteur de féminisation.

La sénescence des plantes, tant en jours courts qu'en jours longs, s'accompagne d'une forte augmentation des peroxydases. Cela a été observé dans de nombreuses autres plantes (voir chapitre V). Les plantes femelles, dont le vieillissement est retardé par rapport à celui des mâles, présentent une augmentation d'activité moins spectaculaire.

X. 2. LES ISOPEROXYDASES ET LEUR RÔLE DANS LA PLANTE

L'électrofocalisation permet la mise en évidence d'au moins 14 isoperoxydases différentes. Toutes n'apparaissent pas dans chaque plante. Elles n'ont pas non plus la même importance et le même comportement vis-à-vis des traitements que subit la plante. Le tableau XII donne une récapitulation générale des principales propriétés de chacune d'entre elles. Il en ressort, si on compare avec les résultats de l'induction mimée, que les peroxydases des feuilles d'Épinard peuvent être classées en deux groupes : les acides et les basiques. Les premières, en jours courts, sont activées par la lumière. Un passage en lumière continue augmente leur activité. Elles suivent la même évolution que la croissance de la plante. L'apparition et la disparition des diverses isoperoxydases de ce groupe sont plus ou moins étroitement liées à la nature de la photopériode. L'acide gibbellerique, qui provoque l'induction florale, produit sur elles les mêmes effets que la lumière continue.

TABLEAU XII. RECAPITULATION DES PRINCIPALES PROPRIETES DES ISOPEROXYDASES EXTRAITES A pH 7 ET SEPARÉES PAR ELECTROFOCALISATION.

Isoperoxydases (p.i.é.)	Spécificité	Induction	AG	AIA	Kin.	Lumière (en JC)
4,2	JL	+				
4,4	JC*					
4,7	JL*	+				
5,1	JL	+	+			
5,3	JC	-	-			
5,5	JL	+	+			
5,8	JC	-	-			
6,3						
6,7	♀	+				
7,2	♂	+			+	
8,5		-				
9,5						
10,2		-	-	-	-	-
11,0		-	-	-	-	-

p.i.é.:point isoélectrique

+ augmentation d'activité

- diminution d'activité

* incertain

Les peroxydases basiques, elles, suivent une évolution inverse à celle de la croissance de la plante. Comme dans d'autres exemples cités plus haut, ce groupe de peroxydases apparaît comme un véritable antagoniste de la croissance. Le transfert de jours courts en lumière continue qui permet à la fois la croissance et le développement de l'Épinard abaisse leur activité. Il s'agit d'un phénomène unique. En effet, lorsque des plantes ayant subi l'induction et remises en jours courts sont à nouveau transférées en lumière continue (induction mimée), on observe au contraire une augmentation de leur activité. Ce groupe est donc intéressant dans la mesure où, comme l'induction florale, il réagit de façon irréversible au transfert en jours longs. Comme la même cause. (passage en lumière continue) ne produit pas les mêmes effets suivant que les plantes sont induites ou non, on doit

conclure que l'induction photopériodique modifie de façon profonde et durable le contrôle de l'activité de ce groupe d'isoperoxydases. D'autre part, ces enzymes ont la propriété de réagir en jours courts à l'acide gibberellique, à l'acide 3-indolylacétique ou à la kinétine par une nette diminution d'activité, du moins dans les conditions utilisées dans ce travail. Ces faits semblent indiquer qu'elles ont un rôle non négligeable dans le fonctionnement de l'organisme végétal. Il est en effet difficile d'imaginer que des enzymes dont la régulation et les relations avec d'autres processus physiologiques sont si nombreuses et si complexes ne soient pas fonctionnelles. Toutes ces raisons nous ont amenés à étudier de façon plus approfondie ces isoperoxydases. Nous reviendrons plus loin sur cette étude.

Le transfert en jours longs fait apparaître quelques peroxydases supplémentaires. Cela n'est pas étonnant, puisque le développement de la plante se trouve favorisé et diversifié. On peut donc s'attendre à ce qu'un plus grand nombre de gènes se trouve activé. La floraison peut d'ailleurs être présentée comme le résultat d'une dérépression de gènes sous l'effet de la photopériode favorable (Moshkov et al., 1967) ou de tout autre facteur exogène ou endogène. Cela est particulièrement vrai pour l'Épinard dont la floraison s'accompagne d'un profond remaniement morphologique (montaison).

Nous avons vu que la sexualisation des plantes donnait lieu à une évolution différente des peroxydases totales et basiques chez les mâles et chez les femelles. Cette évolution est probablement liée aux besoins en auxines et au vieillissement propres aux deux types de plantes. Toutefois, il n'y a pas de grande différence dans la répartition isozymique.

Bien que le comportement des deux groupes de peroxydases soit clairement établi vis-à-vis de la croissance, il n'est pas possible pour l'instant d'assigner un rôle physiologique précis à chaque isozyme. Nous avons déjà mentionné dans l'introduction les fonctions qui sont générale-

ment attribuées aux peroxydases. Le comportement spécifiques de certaines d'entre elles pourrait indiquer qu'elles ne jouent pas toutes le même rôle dans la plante. Il faut rappeler que leur protéine différente leur confère des spécificités et des propriétés physico-chimiques différentes. De nombreux auteurs ont montré que des peroxydases d'un même tissu pouvaient présenter des différences d'affinité avec un substrat et des différences cinétiques (Ida et al., 1970; Evans, 1970; Chmienicka et al., 1971; Kamel et Ghazy, 1973). Si chacune d'entre elles peut agir comme auxine-oxydase en présence de cofacteur approprié, il est cependant probable que seules certaines agissent comme telles *in vivo*. Il existe même des peroxydases qui ne dégradent pas l'AIA (van der Mast, 1970d). On peut donc supposer que, selon leur situation dans la cellule et leurs caractéristiques physico-chimiques, les peroxydases jouent de nombreux rôles différents.

La destruction d'AIA nécessite vraisemblablement la présence de peroxyde en quantités catalytiques (Yamazaki et Yamazaki, 1973). L'oxydation directe de l'auxine par certaines peroxydases n'est cependant pas exclue (Ricard et Nari, 1966). *In vivo*, dans les racines de Pois, les enzymes responsables de la dégradation de l'auxine seraient formées de deux parties, l'une peroxydative, l'autre non (van der Mast, 1969 et 1970a). Ce complexe serait associé aux membranes de façon électrostatique et des peroxydases serviraient au transport des radicaux libres libérés d'AIA (van der Mast, 1970c, 1970d et 1970e). Le catabolisme auxinique serait donc le résultat du travail d'une structure complexe, formée de plusieurs enzymes.

Les peroxydases ont, d'autre part, la propriété de former avec l'oxygène un composé, l'oxyperoxydase, de façon analogue à l'hémoglobine. Cette oxyperoxydase réagit avec de nombreux donneurs d'électrons et apparaît de ce fait comme un mécanisme d'activation enzymatique de l'oxygène (Tamura et Yamazaki, 1972). Il n'est pas exclu de penser que les peroxydases soient engagés dans le transport et l'utilisation de l'oxygène, dans certaines parties de la cellule.

Les peroxydases me sont donc probablement pas seulement des enzymes responsables du catabolisme ou de l'anabolisme de certaines molécules. Bien que la démonstration expérimentale manque, on peut raisonnablement penser qu'elles interviennent d'une façon ou d'une autre dans les processus émergétiques de la cellule. Cela donne une autre dimension à leur étude et implique qu'il ne faut pas forcément chercher à lier l'évolution de chacune d'entre elles au cours de la vie de la plante à une hormone, tels que l'AIA ou l'éthylène.

Un autre point particulier aux peroxydases est leur liaison avec les structures de l'appareil génétique: ribosomes, chromosomes, nucléoles et acides ribonucléiques (pour les références, voir l'introduction). Le fait que les peroxydases liées aux ribosomes et aux chromosomes soient de types allostériques engage Raa (1971 et 1973b) à présenter l'hypothèse que c'est par leur intermédiaire que l'auxine contrôlerait dans une certaine mesure la synthèse des protéines et l'expression de certains gènes. Il ne faut pas oublier que la plupart des tissus présentent une forte activité des peroxydases basiques qui pourraient jouer le rôle dévolu aux histones. Ces isoperoxydases suivent généralement, rappelons-le, une évolution inverse à celle de la croissance du tissu. L'Epinard présente, surtout lorsqu'il est en phase végétative ou en sénescence, une importante activité de telles enzymes, dont la cinétique de dégradation de certains substrats est de type allostérique.

Mais ce n'est pas la seule façon d'expliquer la présence des peroxydases au niveau des ribosomes et des chromosomes, pour autant qu'il ne s'agisse pas d'artéfacts et que cette présence ait une signification physiologique. On peut rappeler par exemple qu'elles sont capables de modifier certains peptides ou protéines par oxydation (Saunders et al., 1964). D'autre part un produit de l'oxydation de l'AIA par les peroxydases (le 3-méthylène oxindole) présente, par rapport à l'AIA, une capacité de liaison avec les histones de thymus de veau beaucoup plus élevée (Demorest et Stah-

man, 1972). Tuli et Moyed (1969) ont montré que le méthylène oxindole a une activité auxinique plus grande que l'AIA. Les peroxydases pourraient donc agir en activatrices de cette hormone en la convertissant en méthylène oxindole. L'augmentation d'ARN synthétisé par l'auxine (Trewavas, 1968) serait le résultat de cette conversion. En conséquence, les peroxydases seraient donc chargées dans une certaine mesure du contrôle de l'expression du génome, notamment dans les cas où la plante subit un traumatisme ou une infection (Stahman et Demorest, 1972).

Il est évident, d'après les quelques exemples présentés ci-dessus, que ces enzymes enfermées pendant un certain temps dans le cadre strict du simple catabolisme auxinique sont en fait riches de potentialités diverses. Il s'agit maintenant de vérifier si elles se réalisent vraiment *in vivo*.

X. 3. MODIFICATIONS RAPIDES DE L'ACTIVITE DES PEROXYDASES BASIQUES

Trois minutes après le début d'un éclairnement rouge lointain, les peroxydases basiques montrent un changement d'activité reproductible pour des plantes cultivées dans des conditions déterminées. Une réaction aussi rapide ne peut s'expliquer par la synthèse de nouvelles protéines, si bien que la théorie de Schopfer n'est pas valable dans ce cas. Cette explication, il faut la chercher dans une relation physiologique directe entre le phytochrome et les peroxydases.

Le phytochrome agit probablement de façon rapide en modifiant le potentiel bioélectrique des membranes (Newman et Briggs, 1972), en changeant la perméabilité de certains compartiments cellulaires (Haupt, 1972; Queiroz, 1972) ou par l'entremise d'un changement de conformation de sa protéine (Roux, 1972) qui pourrait amorcer certaines réactions biochimiques ou activer certaines enzymes. *In vitro*, une membrane lipidique artificielle associée à des molécules de phytochrome voit ses propriétés physico-chimiques modifiées sous l'action d'un éclairnement rouge ou rouge lointain (Roux et Yguerabide, 1973). L'action directe du phytochrome sur certaines

enzymes a déjà été démontrée. Dans la tige de Pois ou le coléoptile d'Avoine, le pigment est associé à la NAD kinase en un complexe actif in vitro (Tezuka et Yamamoto, 1972). La glucose-6-phosphate deshydrogénase de particules de Haricot sédimentant entre 1000 et 7000g réagit également in vitro au système P_r/P_{fr} (Manabe et Furuya, 1973). Dans ce cas, comme dans celui de la NAD kinase, la réaction est réversible et les variations d'activités apparaissent en quelques minutes. Notons encore que la lumière rouge a d'autres effets sensibles à court terme, parmi lesquels l'absorption d'oxygène et de phosphate minéral et la consommation d'ATP (Yunghans et Jaffe, 1972).

Il est difficile, à partir des résultats présentés dans ce travail, de trouver une explication satisfaisante du mécanisme d'action du phytochrome sur les peroxydases basiques. Mais on peut émettre quelques hypothèses.

a) Konishi et Galston (1964) ont montré que des inhibiteurs phénoliques des auxine-oxydases subissent des variations quantitatives après seulement 1 minutes de lumière rouge ou rouge lointain. Dans les cotylédons étiolés de Pharbitis, R et RL ont le même effet. Comme les phénols peuvent se fixer aux protéines et en modifier les propriétés (Fieldes et Tyson, 1973) et comme, d'autre part, ils interviennent dans de nombreux processus peroxydasiques, il est possible que les variations d'activité observées soient dues à l'interaction de ce type de molécules et des peroxydases. La liaison entre le phytochrome et les peroxydases serait assurée par des effecteurs responsables, d'une façon ou d'une autre, de l'activation ou de l'inactivation des enzymes.

b) Le fait que les peroxydases et le phytochrome puissent être liés aux membranes peut suggérer que ce sont elles qui servent de liens entre les enzymes et le pigment (Wagner et Cumming, 1970). Ces liens seraient de nature conformationnelle: le changement de structure du phytochrome se

répercuterait sur l'activité des peroxydases à travers la membrane, ou bioélectrique: le phytochrome, en modifiant les propriétés électrostatiques des membranes, favorise le relargage (activation) ou la fixation (inactivation) des peroxydases. L'impact du phytochrome sur les membranes est confirmé par les changements observés dans la perméabilité et les potentiels bioélectriques après des éclairagements R et RL (Tanada, 1968; Jaffe, 1968; Roux et Yguerabide, 1973), par l'apparente synthèse de lipoxygénase dans les cotylédons de *Sinapis* contrôlée par le phytochrome situé dans l'hypocotyle (Oelze-Karow et Mohr, 1973; Schäfer et al., 1973), ainsi que par le fait que l'éclairement d'un organe peut induire la biosynthèse de chlorophylle dans un autre organe, sans que ce dernier ait reçu de la lumière (de Greef et Caubergs, 1973). La possibilité de remplacer la lumière rouge par l'acétylcholine est également un argument en faveur de cette hypothèse.

c) Il existe de nombreuses enzymes activées par la lumière (Zucker, 1972), dont une peroxydase de chloroplaste (Ivanova et al., 1970). Cette activation passe souvent par une réduction enzymatique qui utilise le NADH ou le NADPH formé lors de la photosynthèse. La L-phényl-ammonia-lyase (PAL), enzyme-clef dans la biosynthèse des acides cinnamiques, existe sous une forme active et une forme inactive, dont les propriétés immunologiques et de liaisons avec le substrat sont identiques (Blondel et al., 1973). Cette enzyme est un tétramère (Havir et Hanson, 1973). La lumière a pour résultat de l'activer. Le phytochrome contrôle peut-être le rapport PAL active/PAL inactive et peut de ce fait moduler l'activité de cette enzyme. D'autre part, il a été démontré que la lumière modifierait certaines propriétés physico-chimiques de la PAL (Attridge et Smith, 1973). Il n'est pas exclu que les peroxydases puissent exister elles-aussi sous une forme inactive, bien que rien n'étaye cette hypothèse. Mais on sait que les catalases peuvent être inactivées in vitro par la lumière bleue (Björn, 1969). Comme ces enzymes pourraient n'être, du moins dans certains cas, que des peroxy-

dases polymérisées, on ne peut exclure la possibilité d'une action directe de la lumière sur les peroxydases, qui sont quand même des pigments.

d) Les changements d'activité des peroxydases basiques sous l'action des lumières rouge et rouge lointain pourraient s'expliquer aussi par des variations dans l'état de polymérisation et dans la cinétique des enzymes. Ce phénomène ne semble cependant pas pouvoir rendre compte de l'importance des variations quantitatives observées (voir chapitre IX). La nature oligomérique des peroxydases n'est d'ailleurs pas établie, bien que les chromatographies sur Sephadex G100 et les études cinétiques permettent de l'envisager sérieusement.

La possibilité pour les peroxydases de se décomposer dans certaines conditions en petites unités catalytiques non seulement chez l'Epinard mais aussi chez le Pois (Janssen, 1970b) est une indication supplémentaire en faveur de l'existence de sous-unités dans les peroxydases. C'est en faisant varier la polymérisation de ces enzymes, mais aussi peut-être en masquant ainsi des sites actifs, que le phytochrome agirait sur leur activité. Il ressort des études cinétiques et de la taille des peroxydases que la lumière favoriserait la polymérisation (ou l'accroissement du poids moléculaire). Cette augmentation de tailles'accompagne d'une perte d'activité. On peut donc en déduire qu'elle provoque une diminution des sites actifs disponibles ou une baisse de leur affinité pour le substrat, à moins que la perte d'activité ne soit un processus parallèle, mais obéissant à un mécanisme différent. Le contrôle de la polymérisation et de l'activité pourrait évidemment être assuré par un effecteur, ce qui nous ramènerait à la première hypothèse (a). La possibilité qu'une grosse molécule se fixe sur les peroxydases et en réduise l'activité ne peut être écartée non plus.

X. 4. RELATIONS ENTRE L'ETAT PHYSIOLOGIQUE DE LA PLANTE ET LE COMPORTEMENT DES PEROXYDASES BASIQUES

L'existence d'oscillations de l'activité des peroxydases basiques en réponse à un éclair de RL ne fait pas de doute. Il a été démontré qu'en effectuant les dosages à un temps précis après le début de l'éclair, la nature de la variation observée par rapport à un témoin dépendait de l'environnement lumineux de la plante. Le facteur déterminant serait l'état du phytochrome. On sait que ce dernier subit une transformation en lumière rouge ($P_{fr} \rightarrow P_r$) et une autre, lente, à l'obscurité ($P_{fr} \rightarrow P_r$). Cette variation dépendante des conditions d'éclairement s'accompagne de changements dans la quantité de phytochrome présent dans un tissu (Hillman, 1967). On observe ainsi des oscillations amorties synchrones dans les cotylédons de *Raphanus* (Malcoste et al., 1971), dans une période de 12 heures de RL et de 12 heures d'obscurité. De façon générale, la lumière rouge hâte la destruction du phytochrome, mais cette disparition peut être compensée au bout de quelques heures (Clarkson et Hillman, 1968). La quantité totale de phytochrome et le rapport P_{fr}/P_{tot} que l'on mesure par spectrophotométrie ou extraction ne correspondent pas du tout à ce qui peut être déduit d'expériences physiologiques. Cette absence de corrélation a conduit à la notion de "bulk phytochrome" inactif physiologiquement, le phytochrome actif étant probablement en petites quantités difficilement mesurables par des méthodes directes. (Kendrick et Hillman, 1972).

Les peroxydases basiques sont en relation avec un phytochrome physiologiquement actif. La forme P_{fr} de celui-ci subit évidemment des fluctuations au cours du cycle jour/nuit. Nous avons vu que la nature des oscillations de l'activité peroxydasique photostimulée par 2 minutes de RL subit aussi des fluctuations. Toutefois, ces oscillations débutent toujours par une baisse d'activité, très réduite après une période d'obscurité. Au con-

traire, la durée de cette baisse s'accroît durant le jour court et encore plus lorsqu'on prolonge la durée de la période lumineuse (induction). On peut imaginer, étant donné leur parallélisme apparent, qu'il y a un lien entre le niveau de la forme P_{fr} et l'importance de cette phase initiale de diminution d'activité (fig. 71). L'amplitude de l'oscillation de l'activité peroxydasique serait dépendante de la quantité de P_{fr} , comme cela a été démontré pour l'adénylate kinase chez *Chenopodium rubrum* (Frosch et Wagner, 1973). Si cette hypothèse est juste, le taux de P_{fr} serait maximum 32 heures environ après le transfert en lumière continue. Il diminuerait ensuite, ce qui pourrait correspondre à sa destruction.

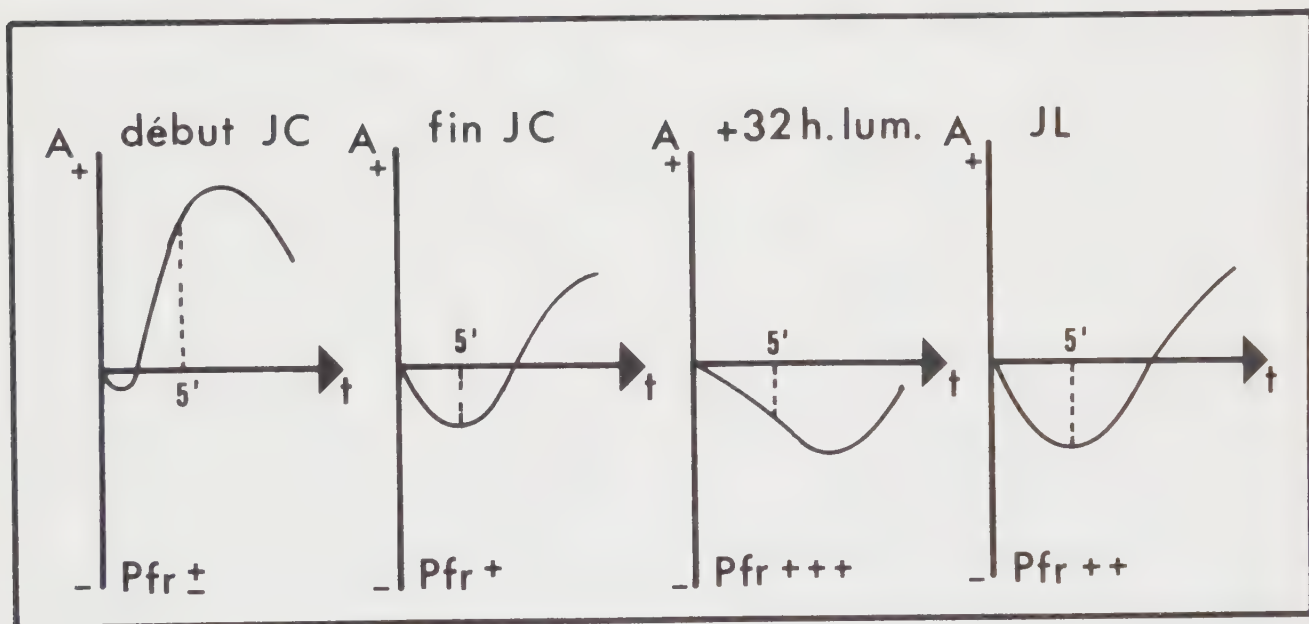


Fig. 71. Oscillation de l'activité des peroxydases basiques due à 2 min de RL, en fonction de l'état physiologique de la plante et de la quantité présumée de P_{fr} responsable de son déclenchement. La durée de la phase initiale de diminution de l'activité serait proportionnelle à la quantité de P_{fr} et correspondrait à sa conversion sous l'action de RL.

On peut remarquer que la relation phytochrome-peroxydases, démontrée dans ce sens, pourrait également exister dans l'autre, puisque l'on sait que la destruction du phytochrome nécessite un ion métallique et de l'oxygène, qu'elle est favorisée par le fer qui peut lever l'inhibition

due à un agent chélatant, qu'elle requiert une synthèse de protéine et qu'elle n'est pas fonction de la respiration ou de la phosphorylation oxydative (Kidd et Pratt, 1973). Une fois enclenchée, l'oscillation de l'activité des peroxydases basiques se poursuit mais son évolution n'a pas été étudiée dans ce travail. Il n'est pas possible de dire non plus si elle est due à des facteurs métaboliques (de type feed-back), à une relation particulière entre le pigment et l'enzyme, à des modifications conformationnelles ou aux particularités physico-chimiques des peroxydases. Dans ce dernier cas, les oscillations observées ici seraient du même type que celles rapportées par Yamazaki et Yokota (1973).

Cette réaction rapide, qui pourrait correspondre à un ajustement immédiat de l'activité des peroxydases basiques à l'environnement de la plante, n'exclue pas la possibilité de l'intervention du phytochrome sur la biosynthèse des peroxydases chez l'Épinard, telle qu'elle a été montrée par Schopfer (1972) dans des plantes étiolées de *Sinapis*. Le pigment intervient en effet sur l'appareil génétique et permet la synthèse de certaines protéines (Mohr, 1966). L'obscurité, comme une heure de RL en présence de lumière blanche, permet une appréciable augmentation de l'activité des peroxydases basiques, alors que la lumière blanche seule leur est défavorable. Il y a là des indications d'un effet inhibiteur de P_{fr} sur la biosynthèse (ou l'activation) des peroxydases.

Les peroxydases basiques, généralement antagonistes de la croissance, réagissent de la même façon dans les feuilles de Tabac (de Jong, 1973). Cependant, il n'est pour l'instant pas possible de dire si cette action à plus long terme de la lumière est, dans le cas de l'Épinard ou du Tabac, le résultat d'une néosynthèse et d'une dégradation des peroxydases basiques ou simplement d'une activation et d'une inactivation d'une quantité stable d'enzyme.

X. 5. LES PEROXYDASES ET LA FLORAISON

Le but de ce travail est la recherche de liens éventuels entre l'induction florale et les peroxydases. Nous avons vu que les niveaux des activités totales et basiques subissent chez les jeunes plantes une diminution qui prend fin au moment où l'apex de celles-ci présente les premiers signes de l'induction florale. Chez une plante cultivée en jours courts et transférée en lumière continue, l'activité des peroxydases totales extraites à pH 7 commence par augmenter avant de tomber à un niveau inférieur à celui de jours courts. Cette augmentation est due aux peroxydases acides, qui semblent être liées à la croissance dans plusieurs plantes. Le rapport des activités acides/basiques est également plus grand après ce transfert, mais seulement chez des plantes non induites. Ce fait montre que, parallèlement à l'irréversibilité de l'induction florale (Zeevaart, 1962), se produit une modification définitive du contrôle des peroxydases. L'analyse des électrofocalisations de l'induction mimée montre que cette modification concerne probablement les peroxydases basiques.

Celles-ci, lorsqu'elles sont extraites à pH élevé, réagissent au transfert en lumière continue par une augmentation transitoire de leur activité. Comme cette réponse n'est pas révélée par une extraction à pH 7, on peut en déduire qu'une bonne partie de ces enzymes sont liées à des structures cellulaires, ce qui est confirmé par des dosages sur des culots de centrifugation différentielle. Il semble bien aussi que c'est l'activité liée qui augmente après induction. Il est bon de rappeler que les auxines sont généralement défavorables à la floraison (Lang, 1965). L'augmentation passagère de l'activité des peroxydases basiques est peut-être à mettre en parallèle avec une baisse du taux de ce type d'hormone.

TABLEAU XIII. RESUME DE QUELQUES RESULTATS CONCERNANT L'ACTIVITE DES PEROXYDASES BASIQUES, SA REPONSE A 2 MIN DE RL ET L'ETAT DE L'APEX.

	Activité	Réponse au RL	Etat de l'apex
JC	-	type JC	non induit
JC + lumière	augmentation	type JL	induit
JC + lumière + DCMU	légère augmentation	type JC	non induit
JC + Ach	augmentation	type JL	légèrement induit

Le comportement de ces peroxydases basiques est sur bien des points identique à celui de l'induction florale (tableau XIII). Nous avons vu que la lumière agit sur l'activité peroxydasique par l'intermédiaire du phytochrome, mais aussi probablement de la photosynthèse (apport énergétique ou bioélectrique). Ces deux médiateurs sont peut-être liés dans le système de réaction à haute énergie (Schneider et Stimson, 1972). Greppin et al. (1973) ont proposé un mécanisme de relation dans lequel la photosynthèse non cyclique produirait suffisamment d'électrons en jours longs pour catalyser la réaction $P_R \rightarrow P_{fR}$. Cette voie particulière permettrait l'obtention d'un taux en P_{fR} supérieur à celui dû à l'action directe de la lumière sur le pigment. La photosynthèse peut aussi interagir avec le phytochrome par les agents réducteurs qu'elle produit et qui peuvent favoriser la conversion $P_{fR} \rightarrow P_R$ à l'obscurité (Mumford et Jenner, 1971). On peut d'ailleurs signaler que dans des essais préliminaires nous avons remarqué qu'un traitement au DCMU de plantes cultivées en jours courts n'affecte pas ou peu la diminution d'activité durant la photopériode mais empêche en revanche l'augmentation de cette activité pendant la nuit.

Le DCMU inhibe l'induction florale chez l'Epinard aussi bien que chez *Chenopodium rubrum* (Sawhney et Cumming, 1971) et chez *Anagallis arven-*

sis (Imhoff, 1973). Dans ce dernier cas, le saccharose est capable de lever l'inhibition. Cela indiquerait que la photosynthèse est requise lors de l'induction surtout pour son apport énergétique, plutôt que par ses interactions avec le phytochrome. Chez l'Épinard, le DCMU donné lors du transfert en jours continus, inhibe l'augmentation d'activité des peroxydases basiques et la transformation de leur réponse au rouge lointain en même temps que l'induction florale.

L'acétylcholine, dont l'existence a été démontrée récemment chez les plantes (Horton et Felipe, 1973), peut remplacer la lumière rouge dans un certain nombre de cas. Cependant, elle semble incapable de reproduire d'autres effets, telles que l'inhibition de la croissance de l'hypocotyle de *Sinapis* (Kasemir et Mohr, 1972) ou l'induction de la PAL (Saunders et McClure, 1973). Dans ce dernier cas même l'acétylcholine inhibe l'effet de la lumière rouge. Les exemples présentés dans la littérature permettent d'envisager que les effets de l'acétylcholine se font sentir surtout à court terme. Des traitements répétés, cependant, permettent chez l'Épinard l'apparition de certains signes d'induction florale en jours courts (allongement de l'apex, stimulation des mitoses dans l'apex et modifications des chloroplastes des feuilles). En revanche, une autre plante de jours longs, *Lemna gibba*, a une réponse florale réduite lorsqu'elle est traitée à l'acétylcholine en jours longs (Kandeler, 1972). Chez l'Épinard, elle provoque, comme l'induction photopériodique, l'apparition d'une réponse bioélectrique lors de la photostimulation par la lumière rouge lointain. Les peroxydases basiques présentent une réponse à court terme après son application à la plante. Cette réponse, variable selon l'état de la plante, ressemble à celle qui suit un éclair de lumière rouge. Après 2 traitements à la fin de 2 jours courts consécutifs, les peroxydases basiques réagissent au début du troisième jour comme celles de plantes induites. L'acétylcholine peut donc induire à la fois l'évocation florale de l'apex et la transformation du contrôle de l'activité peroxydasique. Son action fait

apparaître chez des plantes cultivées en jours courts certaines caractéristiques d'un taux élevé en P_{fR} (réponses bioélectriques et comportement des peroxydases basiques).

Une autre comparaison entre l'induction florale et les peroxydases basiques peut être relevée. Il s'agit de leur comportement vis-à-vis d'un éclair de RL lors de l'induction photopériodique. On sait que chez les plantes de jours courts la floraison est inhibée par un éclair de lumière rouge donné pendant la nuit inductrice (Fredericq, 1964), alors que chez les plantes de jours longs, comme l'Epinard, un éclair de rouge lointain pendant la photopériode inductrice est activateur (Vince, 1972; Auderset, 1974).

L'évolution des peroxydases basiques, elle, est bloquée par un éclair de RL donné pendant le transfert. Moins de 10 minutes données à minuit (période critique), pendant les 24 heures de lumière continue, provoquent une inhibition presque complète de l'augmentation d'activité de ces peroxydases. L'allongement de la durée de l'éclair de RL jusqu'à 30 minutes aboutit à une inhibition de même importance. L'augmentation des peroxydases basiques lors de l'induction photopériodique semble donc être la conséquence de l'accumulation de la forme P_{fR} . Le rouge lointain, en convertissant P_{fR} en P_R supprime cette augmentation.

Les mécanismes de contrôle de l'activité des peroxydases basiques et l'induction florale présente donc un certain nombre de points communs. Le parallélisme de leur évolution indique nullement une quelconque participation des peroxydases au mécanisme de l'induction florale. Cependant il rend vraisemblable l'existence d'un processus physiologique antérieur, commun à la fois aux peroxydases et à la floraison. Ce processus pourrait comprendre une espèce de phytochrome responsable à la fois de l'évolution de l'activité enzymatique et de l'induction florale.

On constate que l'augmentation du taux en P_{fR} qui doit normalement faire suite au transfert d'épinards de jours courts en lumière continue s'accompagne de l'apparition d'une réponse bioélectrique à une photostimu-

lation dans le rouge lointain, de l'allongement de la phase initiale de diminution de l'activité des peroxydases basiques sous l'action d'un éclair de RL et de l'augmentation passagère de cette activité.

Si l'hypothèse d'une espèce de phytochrome contrôlant à la fois l'induction florale et les peroxydases basiques est exacte, l'augmentation du taux en P_{fr} déduite de l'étude des peroxydases permet de supposer que c'est lui qui déclenche le mécanisme de l'induction florale. Il faudrait pour cela qu'il atteigne un seuil déterminant, à partir duquel une suite de réactions biochimiques propres à l'induction serait définitivement mise en route. L'acétylcholine permettrait d'atteindre ce seuil en jours courts, le DCMU empêcherait qu'il le soit en jours longs.

XI. CONCLUSION

L'objet de ce travail était la recherche d'une corrélation éventuelle entre l'induction florale et l'activité peroxydasique chez l'Epinard. Nous avons étudié, sur les peroxydases situées dans les feuilles, l'effet de certains traitements (photopériodiques, chimiques ou autres) dont l'impact sur l'induction florale est connu. Il résulte de cette étude que les peroxydases présentent un ensemble de caractéristiques (niveau d'activité, sensibilité à divers facteurs) qui diffère selon que la plante est induite à fleurir ou non. Chez les plantes qui ont subi la photopériode favorable à la floraison (ou un traitement chimique de remplacement: acide gibberellique, acétylcholine), il existe une véritable "état induit des peroxydases", qui semble acquis définitivement. Cet état, ou du moins certains des éléments qui le définissent, apparaît très tôt dans la période de lumière inductrice, avant que le méristème apical ne montre les premiers signes de l'évocation florale. La chronologie de ces événements et l'irréversibilité conjointe de l'aptitude à fleurir et de "l'état induit des peroxydases" constituent deux arguments en faveur d'une forte corrélation de l'activité des peroxydases et de la floraison. Il n'y a cependant pas d'argument décisif pour affirmer que ces enzymes participent directement au mécanisme de déclenchement de la mise à fleurs chez l'Epinard.

La mise en évidence de l'état induit des peroxydases et de ses liens avec la floraison, outre sa nouveauté, a au moins deux intérêts. Le premier est de permettre une identification rapide de l'état induit ou non d'une feuille (par induction mimée ou photostimulation). Jusqu'à présent,

la seule façon de savoir si une feuille était induite, c'est à dire émettrice du stimulus floral, était de la greffer à une plante non induite. Il s'agit d'une procédure longue et impossible à pratiquer chez beaucoup d'espèces, dont l'Épinard. Les techniques utilisées ici sont beaucoup plus rapides.

Le second intérêt, c'est de permettre d'aborder le coeur du problème de la floraison, c'est-à-dire les événements primaires qui se déroulent dans la feuille, dans les premières heures de l'induction. L'étude précise de la cinétique d'apparition de "l'état induit des peroxydases" et l'analyse des transformations que subissent les peroxydases pour acquies cet état seront certainement très précieuses pour mettre en évidence ces événements et connaître leur nature. Les liens très étroits qui relient les peroxydases et une partie au moins du phytochrome permettront peut-être de comprendre les bouleversements physiologiques subis par la plante au moment de l'induction.

Enfin les peroxydases basiques qui présentent certains signes de régulation allostérique (relevés au chapitre IX) pourraient jouer un rôle dans l'adaptation du fonctionnement cellulaire aux variations du milieu. Ce rôle pourrait concerner des transports d'électrons ou d'oxygène à l'intérieur des cellules.

XII. RESUME

Nous avons étudié les peroxydases de feuilles de *Spinacia oleracea* (plantes de jours longs) cultivées en conditions non inductrices de floraison (jours courts), en conditions inductrices (lumière continue) et lors du passage de jours courts en lumière continue. Cette étude a porté sur deux types de peroxydases: les totales extraites à pH 7 et les basiques extraites à pH alcalin et isolées par fixation sur CM Sephadex à pH 9,2.

Les peroxydases totales, dans les feuilles adultes non sénescentes, subissent au cours de la vie de la plante la même évolution en jours courts et en jours longs. Dans les deux cas, leur activité diminue jusqu'à ce que les plantes aient 4 feuilles. Ensuite elle augmente. Elle est moins élevée en lumière continue qu'en jours courts. Lorsque les plantes sont soumises à une alternance jour court/nuit longue, elle suit la photopériode: elle est plus basse à la fin de la période de lumière qu'à la fin de la nuit. Un transfert en lumière continue abolit cette variation journalière. L'activité est alors minimum après 16 heures de lumière continue,, ensuite elle augmente et suit l'évolution propre aux peroxydases de plantes cultivées en jours continus.

L'activité totale peut être séparée en plusieurs fractions isoperoxydasiques. A cette fin, nous avons utilisé les gels Sephadex (SE Sephadex C50/Sephadex G100), l'électrophorèse sur polyacrylamide et l'électrofo-calisation. Cette dernière permet la mise en évidence de 14 isoperoxydases, l'électrophorèse de 9 et les gels Sephadex de plus d'une dizaine, qui coïncident de façon assez étroite avec l'activité AIA-oxydasique. Ces trois

techniques montrent que ce sont les peroxydases basiques (ou cationiques) qui sont les plus sensibles aux modifications des conditions d'éclairement. Elles réagissent par une nette diminution d'activité au transfert en lumière continue. Les peroxydases acides ont un comportement opposé. Le rapport entre les activités de ces deux groupes d'enzymes (a/b) augmente nettement au moment du transfert en lumière continue. Si les plantes transférées ont été préalablement induites (induction mimée) leur rapport a/b au contraire diminue. Il s'agit là d'un moyen de distinguer des feuilles induites de feuilles non induites. L'électrofocalisation montre aussi que les modifications qualitatives du profil isoperoxydasique concerne uniquement les peroxydases acides. Ces modifications semblent avant tout dépendre de la photopériode et non de l'état physiologique des feuilles (induites ou non). Les épinards mâles et femelles ne présentent qu'un très petit nombre de différences dans leur activité et leur profil isozymique.

L'activité des peroxydases basiques extraites à pH alcalin évolue au cours de la vie de la plante de façon similaire à celle des peroxydases totales et cela aussi bien en jours courts qu'en jours longs. Il n'en est pas de même lors du transfert de jours courts en lumière continue. Dans ce cas, après 16 heures de lumière, les peroxydases basiques sont nettement plus actives qu'elles ne l'étaient en jours courts à la même heure. Cette augmentation se poursuit pendant les 32 premières heures de lumière environ. De ce fait, le rythme d'activité des peroxydases basiques de plantes en jours courts disparaît. En revanche, le rythme des protéines basiques semble se maintenir.

Les peroxydases basiques sont extrêmement sensibles aux conditions d'éclairement de la plante. Leur activité est contrôlée par le phytochrome de façon très rapide. Elle est modifiée déjà 3 minutes après le début d'un éclairage rouge lointain (730 nm). La lumière rouge (660 nm) a un effet inverse. Le rouge lointain semble déclencher une oscillation de cette acti-

tivité. La réponse des peroxydases basiques dépend à la fois du phytochrome et de l'état des feuilles (induit ou non). Leur régulation pourrait être de type allostérique. Il s'agit d'un second moyen de distinguer les feuilles induites des feuilles non induites.

Les résultats présentés permettent la mise en évidence d'un "état induit des peroxydases" dont l'apparition dans les feuilles est parallèle à celle de l'induction, sans que l'on puisse dire pour l'instant qu'il y a entre les deux une relation de cause à effet. Toutes deux sont induites en jours courts par l'acétylcholine et sont bloquées par le DCMU lors du transfert en lumière continue.

Les divers résultats présentés ci-dessus sont discutés et des mécanismes expliquant le mode de régulation de l'activité peroxydasique par le phytochrome sont proposés.

XIII. SUMMARY

We studied peroxidases in the leaves of *Spinacia oleracea* (a long day plant) grown under non inductive conditions (short days), under inductive conditions (continuous light) and during a transfer of short-day grown plants to continuous light. This study was conducted on peroxidases extracted at pH 7 and on peroxidases extracted at pH 10,5 and separated on CM Sephadex C50 at pH 9,2 (basic peroxidases).

In full-grown but non senescent leaves, peroxidases undergo a similar evolution under short days and under continuous light. In both cases, their activity decreases until the plants have four leaves. Then it increases. It is lower under continuous light than under short days. In this latter case, it follows the light periodicity (higher at the end of the long night and lower at the end of the short day). A transfer to continuous light suppresses this daily variation and the activity reaches a minimum approximatively 16 hours after the start of the inductive treatment. Then it increases and follows the evolution observed in plants grown under continuous light.

We used Sephadex resins (SE Sephadex C50/Sephadex G100), polyacrylamide electrophoresis and isoelectric focusing in order to separate the peroxidase activity into its isoperoxidasic components. The number

of peroxidases obtained is different in each case: fourteen by isoelectric focusing, nine by acrylamide electrophoresis and about ten after gel filtration. In this latter case, IAA oxidase activity is generally associated to the peroxidase peaks.

Basic (or cationic) peroxidases (b) appear to be very sensitive to the illumination conditions. Their activity is greatly lowered by a transfer from short days to continuous light, when the activity of the acidic (or anionic) ones (a) is enhanced. So, the ratio between these two groups of enzymes (a/b) increases during the transfer. This transfer-induced increase is observed in vegetative plants, but not in plants which have reached the induced state by a previous inductive treatment. The study of the a/b ratio allows us to determine whether a plant is induced, before the appearance of any floral differentiation at the apical level. Isoelectric focusing shows that the qualitative alterations of the isoperoxidasic pattern only affect the acidic peroxidases and are closely related to the length of the photoperiod, not to the physiological state of leaves (induced or non-induced).

The evolution of basic peroxidases extracted at high pH during the life of plants is similar to that of total peroxidases under short days, under continuous light and after a transfer from a condition to the other one. They are very sensitive to light and their activity is controlled by phytochrome. Besides long-term processes, there is an immediate phytochrome-mediated response of basic peroxidase activity to far red and red light. Change in the activity can be observed three minutes after the beginning of light treatment. These observations indicate the existence of a direct regulation mechanism of the enzymes by phytochrome, which does not involve the protein biosynthesis. Far red light induces an oscillation of the activity. It appears that the response pattern is dependent on both phytochrome and state of the leaves (induced or non-induced).

The results shown in this work point out an "induced state of peroxidases" which appears in the leaves parallely to the floral induced state, without one can say now that there is a causal relationship between peroxidases and flowering.

The data are discussed and some possible mechanisms explaining the regulation of peroxidase activity by phytochrome are presented.

XIV. BIBLIOGRAPHIE

- Addathody K. K. et D. Racusen, 1967: *Can. J. Bot.* 45, 2237
- Alvarez M. R. et D. King, 1969: *Amer. J. Bot.* 56, 180
- Andersen R. A. et J. Sowers, 1968: *Phytochem.* 7, 293
- Atkinson D. E., 1966: *Ann. Rev. Biochem.* 35, 85
- Attridge T. H. et H. Smith, 1973: *Plant Sc. Letters* 1, 247
- Auderset G. et H. Greppin, 1972: *Physiol. Vég.* 10, 206
- Auderset G., 1974: Thèse, Université de Genève
- Baldev B. et A. Lang, 1965: *Amer. J. Bot.* 52, 408
- Bavrina T. V., N. Aksenova et T. Konstantinova, 1969: *Fiziol. Rastenii* 16, 381
- Benedict W. G., 1971: *Can. J. Bot.* 49, 1721
- Bernier G., J. M. Kinet et R. Bronchart, 1967: *Physiol. Vég.* 5, 311
- Bernier G., R. Bronchart et J-M. Kinet, 1970: in *Cellular and Molecular Aspects of Floral Induction*, G. Bernier ed., p. 51
- Birecka H., L. Shih et A. Galston, 1972: *J. Exp. Bot.* 23, 655
- Birecka H., K. Briber et J. Catalfamo, 1973: *Plant Physiol.* 52, 43
- Björn L. O., 1969: *Photochem. Photobiol.* 10, 125
- Blondel J-D., C. Huault, L. Faye et P. Rollin, 1973: *FEBS Letters* 36, 239
- Bolduc R. J., J. Cherry et B. Blair, 1970: *Plant Physiol.* 45, 461
- Bonzon M., 1974: Thèse, Université de Genève.
- Borthwick H. A., S. Hendricks et M. Parker, 1948: *Bot. Gaz.* 110, 103
- Borthwick H. A., S. Hendricks et M. Parker, 1956: in *Radiation Biology*, A. Hollaender ed., vol. III, p. 479, Mc Graw Hill
- Bouillenne-Walrand M., C. Leyh, M. Bastin et T. Gaspar, 1967: *Bull. Soc.*

- Roy. Belg. 100, 153
- Bowling A. C. et R. Crowden, 1973: Aust. J. Biol. Sci. 26, 679
- Bredemeijer G. M., 1973: Acta Bot. Neerl. 22, 40
- Brewbacker J. L., M. Upadhy, Y. Mäkinen et T. McDonald, 1968: Physiol. Plant. 21, 930
- Carr D. J., 1967: Ann. N. Y. Acad. Sci. 144, 305
- Chailakhyan M. K., 1936: C. R. (Dokl.) Acad. Sci. URSS 12, 443
- Chailakhyan M. K., 1968a: Ann. Rev. Plant Physiol. 19, 1
- Chailakhyan M. K., 1968b: in Biochemistry and Physiology of Plant Growth Substances, F. Wightman et G. Setterfield eds.
- Chmielnicka J., G. Ohlsson, K-G. Paul et T. Stigbrand, 1971: FEBS Letters 17, 181.
- Chodat R. et A. Bach, 1903: Ber. Deutsch. Chem. Ges. 36B, 606
- Chourey P. S., H. Smith et N. Combatti, 1973: Amer. J. Bot. 60, 853
- Clarkson D. T. et W. Hillman, 1968: Plant Physiol. 43, 88
- Conklin M. E. et H. Smith, 1971: Amer. J. Bot. 58, 688
- Cooke A. R., 1954: Plant Physiol. 29, 440
- Cumming B. G., 1971: Proc. Int. Symp. Circadian Rhythmicity (Wageningen) 33
- Czaninski Y. et A-M. Catesson, 1969: J. Microsc. 8, 875
- Danner D. J., P. Brignac, D. Arceneaux et V. Patel, 1973: Arch. Biochem. Biophys. 156, 759
- Darimont E. et R. Baxter, 1973: Planta 110, 205
- Darimont E., K. Schwachhofer et T. Gaspar, 1973: Biochim. Biophys. Acta 321, 461
- Davis B. J., 1964: Ann. N. Y. Acad. Sci. 121, 321
- Degn H., 1973: in Biological and Biochemical Oscillators, B. Chance, E. Pye, A. Ghosh et B. Hess eds., Academic Press
- De Greef J. A. et R. Caubergs, 1973: Physiol. Plant. 28, 71
- De Jong D. W. A., A. Olson, K. Hawker et E. Jansen, 1968: Plant Physiol. 43, 841

- De Jong D. W., 1972: *Plant Physiol.* 50, 733
- De Jong D. W., 1973: *Amer. J. Bot.* 60, 846
- Demorest D. M. et M. Stahman, 1972: *Biochem. Biophys. Res. Com.* 47, 227
- Elkinawy M. et J. Raa, 1973: *Physiol. Plant.* 29, 250
- Engelsma G. et G. Meijer, 1965: *Acta Bot. Neerl.* 14, 73
- Evans J. J., 1970: *Plant Physiol.* 45, 66
- Evans L. T., 1971: *Ann. Rev. Plant Physiol.* 22, 365
- Evans J. J. et N. Allridge, 1965: *Phytochem.* 4, 499
- Fieldes M. A. et H. Tyson, 1973: *Phytochem.* 12, 2133
- Fox R. et W. Purves, 1968: *Plant Physiol.* 43, 454
- Fredericq H., 1964: *Plant Physiol.* 39, 812
- Freudenbreg K., H. Reznick, H. Rosenberg et D. Rasenack, 1952: *Chem. Ber.* 85, 641
- Frosch S. et E. Wagner, 1973: *Can. J. Bot.* 51, 1368
- Frosch S., E. Wagner et B. G. Cumming, 1973: *Can. J. Bot.* 51, 1355
- Gahagan H. E., R. Holm et F. Abeles, 1968: *Physiol. Plant.* 21, 1270
- Galston A. W. et L. Dalberg, 1954: *Amer. J. Bot.* 41, 373
- Galston A. W., 1967: *Amer. Sci.* 55, 144
- Galston A. W. et P. Davies, 1969: *Science* 163, 1288
- Galun E., 1959: *Physiol. Plant.* 12, 48
- Galun E., S. Itzhar et D. Atsmon, 1965: *Plant Physiol.* 40, 321
- Garay A. S., M. Garay et F. Sagi, 1959: *Physiol. Plant.* 12, 799
- Gaspar Th., J. Lacoppe et M. Hofinger, 1969: *Bull. Soc. Roy. Bot. Belg.* 103, 207
- Gaspar Th., Hofinger M. et J. Lacoppe, 1969: *Biochim Biophys. Acta* 191, 463
- Gaspat Th., C. Teppaz-Misson et J-C. Couduroux, 1973: *Biol. Plant.* 15, 197
- Gilson M., 1957: *Bull. Acad. Roy. Belg.* 778
- Goldfisher S. et E. Essner, 1970: *J. Histochem. Cytochem.* 18, 482
- Greppin H., 1965: *Arch. Sci. Genève* 18, 598

- Greppin H., B. Horwitz et L. Horwitz, 1973: Z. Pflanzenphysiol. 68, 336
- Gupta V. et G. Stebbins, 1969: Biochem. Genetics 3, 15
- Haard N. F., 1973: Phytochem. 12, 555
- Halevy A. H., 1963: Plant Physiol. 38, 731
- Hall J. L. et R. Sexton, 1972: Planta 108, 103
- Harada H., 1962: Rev. Gen. Bot. 69, 201
- Hare R. C., 1964: Bot. Rev. 30, 129
- Harkin J. M. et Obst, 1973: Science 180, 296
- Harper H. A., 1965: Précis de Biochimie, ed Colin
- Hartree E. F., 1972: Anal. Biochem. 48, 422
- Haupt W., 1972: in Phytochrome, Mitrakos et Shropshire eds, 349, Academic Press
- Havir E. A. et K. Hanson, 1968: Biochem. 7, 1896
- Heslop-Harrison J., 1957: Biol. Rev. 32, 38
- Hill J. M., 1970: Phytochem. 9, 725
- Hillman W. S., 1964: The physiology of flowering, Holt, Rinehart et Winston eds., New York
- Hillman W. S., 1967: Ann. Rev. Plant Physiol. 18, 301
- Hillman W. S. et A. Galston, 1957: Plant Physiol. 32, 129
- Horton E. W. et G. Felipe: Biol. Plant. 15, 150
- Horwitz B. A. et L. Horwitz, 1973: J. Theoret. Biol. 42
- Hoyle M. C., 1972: Plant Physiol. 50, 15
- Ida S., I. Kitamura et Y. Morita, 1970: Agr. Biol. Chem. 34,
- Imbert M. P. et L. Wilson, 1972: Phytochem. 11, 2671
- Imhoff C., 1973: C. R. Acad. Sci. Paris D276, 3303
- Ivanova T. M., B. Rubin et I. Davydova, 1970: Dokl. Akad. Nauk. SSSR 190, 214
- Ivanova I. et Y. Peive, 1973: FEBS Letters 31, 229

- Jacquemard A., J-P. Miksche et G. Bernier, 1972: *Am. J. Bot.* 59, 714
- Jaffe M. J., 1968: *Science* 162, 1016
- Jaffe M. J., 1970: *Plant Physiol.* 46, 768
- Jaffe M. J., 1972: *Recent Adv. in Phytochem.* 5, 81
- Janssen M. G., 1970a: *Acta Bot. Neerl.* 19, 73
- Janssen M. G., 1970b: *Acta Bot. Neerl.* 19, 419
- Jones J. D., A. Hulme et L. Woollorton, 1965: *Phytochem.* 4, 659
- Kahlem G., 1973: *Z. Pflanzenphysiol.* 69, 377
- Kamel M. Y. et A. Ghazy, 1973: *Phytochem.* 12, 1281
- Kaminski C., 1971: *Planta* 99, 63
- Kanazawa Y., H. Shichi et I. Uritani, 1965: *Agr. Biol. Chem.* 29, 840
- Kasemir H. et H. Mohr, 1972: *Plant Physiol.* 49, 453
- Katsumi M. et H. Sano, 1968: *Physiol. Plant.* 21, 1348
- Kandeler R., 1972: *Z. Pflanzenphysiol.* 67, 86
- Kendrick R. E. et W. Hillman, 1972: *Physiol. Plant.* 26, 7
- Kenten R. H., 1965: *Biochem. J.* 59, 110
- Khudairi A-K. et K. Hamner, 1954: *Plant Physiol.* 29, 251
- Khudairi A-K et J. Maeng, 1973: *Physiol. Plant.* 28, 271
- Kidd G. H. et L. Pratt, 1973: *Plant Physiol.* 52, 309
- Klopfer A., 1973: *Biochem. Physiol. Pflanzen* 164, 383
- Konishi M., 1956: *Mem. Coll. Agr. Kyoto Univ.* 75, 1
- Konishi M., 1972: in *Cellular and Molecular Aspects of Floral Induction*,
G. Bernier ed., p. 255
- Konishi M. et A. W. Galston, 1964: *Phytochem.* 3 559
- Koshland D. E., 1970: in *The Enzymes* 1, P. Boyer ed., Academic Press
- Laibbach F. et F. Kribben, 1950: *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* 62, 53
- Lam T. H. et M. Shaw, 1970: *Biochem. Biophys. Res. Com.* 39, 965
- Lang A., 1965: in *Handbuch der Pflanzenphysiol.*, W. Ruhland ed., vol XV,
1380, Springer Verlag

- Lee T. T., 1971a: Plant Physiol. 47, 181
- Lee T. T., 1971b: Plant Physiol. 48, 56
- Lee T. T., 1972a: Plant Physiol. 49, 957
- Lee T. T., 1972b: Can J. Bot. 50, 2471
- Lee T. T., 1973: Physiol. Plant. 29, 198
- Leopold A., E. Niedergang-Kamien et J. Janick, 1959: Plant Physiol. 34, 570
- Leshem Y., A. W. Galston, R. Kaur-Sawhney et L. Shih, 1970: in Plant Growth Substances, p. 228
- Leshem Y. et A. Galston, 1971: Phytochem. 10, 2869
- Liu E. H. et D. Lamport, 1973: Arch. Biochem. Biophys. 158, 822
- Loomis W. D. et J. Battaile, 1966: Phytochem. 5, 423
- Lowry O. H., N. Rosenbrough, A. Farr et R. Randall, 1951: J. Biol. Chem. 193, 265
- Maciejewska-Potapczykowa W., A. Rennert et E. Milewska, 1972: Acta Soc. Bot. Pol. XLI, 385
- MacNicol P. K., 1973a: Phytochem. 12, 1269
- MacNicol P. K., 1973b: Phytochem. 12, 1273
- Malcoste R., G. Larcher et C. Huault, 1971: C. R. Acad. Sci. D273, 1197
- Manabe K. et M. Furuya, 1973: Plant Physiol. 51, 982
- Mapson L. W. et D. A. Wardale, 1972: Phytochem. 11, 1371
- Matsushita S. et F. Ibuki. 1960: Biochim. Biophys. Acta 40, 540
- Mazza G., 1971: Thèse, Université de Aix-Marseille
- Mazza G., C. Charles, M. Bouchet, J. Ricard et J. Raynaud, 1968: Biochim. Biophys. Acta 167, 89
- Mazza G., C. Job et M. Bouchet, 1973: Biochim. Biophys. Acta 322, 218
- Meudt W. J., 1964: Dissert. Abstr. USA 25, 2191
- Miginiac E. et N. Lacombe, 1973: Can. J. Bot. 51, 465
- Miller J. et C. Ross, 1966: Plant Physiol. 41, 1185
- Misra G. et P. Khan, 1973: Bot. Gaz. 134, 93
- Mohr H., 1966: Photochem. Photobiol. 5, 469

- Moore J. N. et L. Hough, 1962: Proc. Amer. Soc. Hort. 81, 255
- Morgan W. et J. Fowler, 1972: Plant and Cell Physiol. 13, 727
- Moshkov B. S., S. Pumpyanskaya et Y. Fukshanskii, 1967: Fiziol. Rast. 14, 883
- Mumford F. E. et E. Jenner, 1971: Biochem. 10, 1971
- Nakamura S., K. Yokota et I. Yamazaki, 1969: Nature 222, 794
- Newman I. A. et W. Briggs, 1972: Plant Physiol. 50, 687
- Nougarède A., 1965: Bull. Soc. Franç. Physiol. Vég. 11, 105
- Ockerse R., B. Siegel et A. W. Galston, 1966: Science 151, 452
- Oelze-Karow H. et H. Mohr, 1973: Photochem. Photobiol. 18, 319
- Ogawa Y. et J. A. D. Zeevaart, 1967: in Physiology of Flowering in Pharbitis, Shun-Ichiro et Imamura eds., p. 107, Tokyo
- Oota Y., 1965: Plant and Cell Physiol. 6, 547
- Parish R. W., 1969: Z. Pflanzenphysiol. 60, 90
- Parish R. W., 1972a: Z. Pflanzenphysiol. 66, 176
- Parish R. W., 1972b: Eur. J. Biochem. 31, 446
- Peive Y. V., N. Ivanova et N. Drobysheva, 1972: Fiziol Rast. 19, 340
- Penon P., 1970: Thèse, Université d'Aix-Marseille
- Penon P., J-P. Cecchini, R. Miassod, J. Ricard, M. Teissere et M. Pinna, 1970: Phytochem. 9, 73
- Pickering J. W., B. Powell, S. Wender et E. Smith, 1973: Phytochem. 12, 2639
- Pierpoint W. S., 1969a: Biochem. J. 112, 609
- Pierpoint W. S., 1969b: Biochem. J. 112, 619
- Pilet P-E., 1957: C. R. Acad. Sci. 245, 1327
- Pilet P-E., 1967: Physiol. Plant. 20, 285
- Pilet P-E. et G. Collet, 1962: Méthode d'analyse du catabolisme auxinique, Impr. C. Zwahlen, Lausanne
- Pilet P-E et A. Nougarède, 1965: Bull. Soc. Franç. Physiol. Vég. 11, 187
- Pilet P-E. et M-C. Mato, 1967: Ann. Physiol. Vég. 9, 369

- Pilet P-E. et Th. Gaspar, 1968: *Le Catabolisme Auxinique*, Masson ed., Paris
- Pilet P-E., J-P. Zryd et P. Lavanchy, 1967: *Physiol. Vég.* 5, 327
- Pilet P-E. et J. Phipps, 1968: *Planta* 80, 82
- Pilet P-E. et S. Sevhonkian, 1969: *Physiol. Vég.* 7, 325
- Pleniscar M., W. Bonner et B. Storey, 1967: *Plant Physiol.* 42, 366
- Pooaiah B. W, G. West et H. Rasmussen, 1972: *HortScience* 7, 236
- Pooaiah B. W. et H. Rasmussen, 1973: *Plant Physiol.* 52, 263
- Poux N., 1972: *C. R. Acad. Sci. Paris D274*, 735
- Queiroz O., 1972: in *Phytochrome*, Mitrakos et Shropshire eds., p.295
Academic Press
- Raa J., 1971: *Physiol. Plant.* 29, 247
- Raa J., 1973a: *Physiol. Plant.* 28, 132
- Raa J., 1973b: *Physiol. Plant.* 29, 247
- Rathmell W. G. et D. Bendall, 1972: *Biochem. J.* 127, 125
- Radley M., 1970: in *Cellular and Molecular Aspects of Floral Induction*, G. Bernier ed., p. 280
- Retig N. et J. Rudich, 1972: *Physiol. Plant.* 27, 156
- Ricard J. et J. Nari, 1966: *Biochim. Biophys. Acta* 113, 57
- Riddle V. et M. Mazelis, 1964: *Nature* 202, 391
- Ridge I. et D. Osborne, 1970: *J. Exp. Bot.* 21, 843
- Riov. J. et M. Jaffe, 1971: *Plant Physiol.* 47, 549
- Ritzert R. W. et B. Turin, 1970: *Phytochem.* 9, 1701
- Roberts D. W., 1969: *Can. J. Bot.* 47, 263
- Ross C., 1970: in *Cellular and Molecular Aspects of Floral Induction*, G. Bernier ed., p. 139, Longman
- Roux S. J., 1972: *Biochem.* 11, 1930
- Roux S. J. et J. Yguerabide, 1973: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 70, 762
- Rybin I. A., S. Mikheeva et A. Efimov, 1972a: *Fiziol. Rast.* 19, 545
- Rybin I. A., V. Obolonski et A. Efimov, 1972b: *Fiziol Rast.* 19, 1170

- Safonova M., R. Dejaeger et V. Safonov, 1970: Ann. Physiol. Vég. Univ. Bruxelles XV, 31
- Sagi F. et A. Garay, 1961: Naturwiss. 48, 107
- Saunders B. C., A. Holmes-Siedle et B. Stark, 1964: Peroxidase, Butterworths ed., London
- Saunders J. A. et McClure, 1973: Plant Physiol. 51, 407
- Sawhney R. et B. Cumming, 1971: Can. J. Bot. 49, 2233
- Scandalios J. G., 1969: Biochem. Genetics 3, 37
- Schäfer E., E. Schmidt et H. Mohr, 1973: Photochem. Photobiol. 18, 331
- Schneider et W. Stimson, 1972: Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 2150
- Schopfer P., 1972a: in Phytochrome, Mitrakos et Shropshire eds., Academic Press, p. 485
- Schopfer P., 1972b: Symp. Biol. Hung. 13, 115
- Schopfer P., 1973: Ber. Deutsch. Bot. Ges. 86, 271
- Schopfer P. et C. Plachy, 1973: Z. Naturforsch. 28c, 296
- Sequeira L. et L. Mineo, 1966: Plant Physiol. 41, 1200
- Shannon L. M., 1968: Ann. Rev. Plant. Physiol. 19, 187
- Shannon L. M., I. Uritani et H. Imaseki, 1971: Plant Physiol. 47, 493
- Shih J. H., L. Shannon, E. Kay et J. Lew, 1971: J. Biol. Chem. 246, 4546
- Sirju G. et L. Wilson, 1974: Phytochem. 13, 111
- Stahman M. A. et D. Demorest, 1972: Symp. Biol. Hung. 13, 355
- Strickland E. H. et E. Ackerman, 1966: Nature 209, 405
- Stuber C. W. et C. Levings, 1969: Crop Science 9, 415
- Tamura M. et I. Yamazaki, 1972: J. Biochem. 71, 311
- Tanada T., 1968: Proc. Nat. Acad. Sci. USA 59, 378
- Tezuka T. et Y. Yamamoto, 1972: Plant Physiol. 50, 458
- Tran Thanh Van M. et V. Trippi, 1969: C. R. Acad. Sci. Paris D269, 1179
- Trewavas A., 1968: Progress in Phytochem. 1, 113
- Tuli V. et H. Moyed, 1969: J. Biol. Chem. 244, 4916
- Tyson H., 1973: Biochem. Genetics 10, 197

- Umemura K. et Y. Oota, 1965: *Plant and Cell Physiol.* 6, 73
- Upadhy M. et J. Yee, 1968: *Phytochem.* 7, 937
- Van der Mast C. A., 1970a: *Acta Bot. Neerl.* 19, 141
- Van der Mast C. A., 1970b: *Acta Bot. Neerl.* 19, 363
- Van der Mast C. A., 1970c: *Acta Bot. Neerl.* 19, 553
- Van der Mast C. A., 1970d: *Acta Bot. Neerl.* 19, 659
- Van der Mast C. A., 1970e: *Acta Bot. Neerl.* 19, 727
- Van Hoof P. et Th. Gaspar, 1973: *C. R. Acad. Sci. Paris* D277, 933
- Van Lear D. et W. Smith, 1970: *Phytochem.* 9, 1929
- Varga M. et I. Balint, 1966: *Acta Biol. Hung.* 16, 243
- Venis M. A., 1972: *Plant Physiol.* 49, 24
- Verma D. P. et R. van Huystee, 1970: *Can. J. Bot.* 48, 429
- Vince D., 1965: *Physiol. Plant.* 18, 474
- Vince D., 1965: in *Phytochrome*, Mitrakos et Shropshire eds., p. 257
Academic Press
- Wagner E. et B. Cumming, 1970: *Can. J. Bot.* 48, 1
- Wardell W. L. et F. Skoog, 1969: *Plant Physiol.* 44, 1407
- Warner R. M. et M. Upadhy, 1968: *Physiol. Plant.* 21, 941
- Watanabe R. et R. Stutz, 1960: *Physiol. Plant.* 35, 359
- White J. M. et C. Pike, 1974: *Plant Physiol.* 53, 76
- Wise B. et M. Morrison, 1971: *Phytochem.* 10, 2355
- Yamamoto Y., 1972: in *Phytochrome*, Mitrakos et Shropshire eds,
Academic Press
- Yamazaki I. et K. Yokota, 1967: *Biochim. Biophys. Acta* 132, 310
- Yamazaki I. et K. Yokota, 1973: in *Biological and Biochemical Oscillators*,
B. Chance, E. Pye, A. Ghosh et B. Hess eds., p. 109, Academic Press
- Yamazaki H. et I. Yamazaki, 1973: *Arch. Biochem. Biophys.* 154, 147
- Yang S. F., 1968: in *Biosynthesis and Physiology of Plant Growth Substances*
Wightman et Setterfield eds., p. 204

Yokota K. et I. Yamazaki, 1965: Biochim. Biophys. Acta 105, 301

Young M. et C. Steelink, 1973: Phytochem. 12, 2851

Yunghans H. et M. Jaffe, 1972: Plant Physiol. 49, 1

Zaitseva M. G., V. Titova et I. Pavlova, 1972: Fiziol. Rast. 19, 699

Zeevaart J. A., 1962: Science 3532, 723

Zeevaart J. A., 1971a: Plant Physiol. 47, 821

Zeevaart J. A., 1971b: Planta 98, 190

Zucker M., 1972: Ann. Rev. Plant Physiol. 23, 133

